

МЕХАНИЗМЫ ГИБЕЛИ ЛИМФОЦИТОВ ЧЕЛОВЕКА, ИНДУЦИРОВАННОЙ УФ-ИЗЛУЧЕНИЕМ И АКТИВНЫМИ ФОРМАМИ КИСЛОРОДА

М.А. Наквасина¹, В.Г. Артюхов¹, Л.С. Свекло²

¹ФГБОУ ВО «Воронежский государственный университет»

²Филиал БСМП ВО «Воронежская областная станция переливания крови»

Поступила в редакцию 12.01.2023 г.

Аннотация. В обзоре обобщены результаты исследования маркерных показателей (индикаторов) различных путей и механизмов реализации апоптоза лимфоцитов периферической крови доноров, индуцированного воздействием УФ-света (240-390 нм) в дозах 151, 1510, 3020 Дж/м² и активных форм кислорода (пероксида водорода, супероксидного анион-радикала, гидроксильного радикала, синглетного кислорода). Исследованы процессы фрагментации ДНК, нарушения структурной асимметрии плазматических мембран и структурно-функционального состояния мембран митохондрий, изменения уровня повреждений ДНК (однонитевые разрывы), транскрипционного фактора p53, цитохрома с, рецепторов смерти Fas (CD95), каспаз-3, -8, -9, активных форм кислорода, ионов кальция в модифицированных клетках. Установлено, что запрограммированная клеточная гибель лимфоцитов после УФ-облучения в дозе 1510 Дж/м² осуществляется с участием p53-зависимого пути ядерного механизма, а также рецепторопосредованного каспазного, митохондриального и связанного с нарушением кальциевого гомеостаза механизмов, а ее медиаторами являются активные формы кислорода и ионы кальция. Предложена схема возможных внутриклеточных событий, приводящих к апоптотической гибели клеток после их УФ-облучения. Обсуждаются вопросы, касающиеся возможности реализации «быстродействующих» и «долгосрочных» механизмов УФ-индуцированного апоптоза лимфоцитов. Наиболее вероятно, «быстродействующие» пути реализации апоптоза при облучении: митохондриальный как результат генерации активных форм кислорода и связанный с нарушением кальциевого гомеостаза («кальций-зависимые»). «Долгосрочные» механизмы – рецепторный каспазный и ядерный. Усилителями (триггерами) митохондриального механизма апоптоза являются «кальций-зависимый» и ядерный (p53-зависимый путь). Митохондриальный механизм в то же время является «долгосрочным» как результат реализации p53-зависимого пути.

Выявлено, что экзогенный пероксид водорода в конечной концентрации 1 и 10 мкмоль индуцирует в лимфоцитах процессы апоптотической гибели, которые реализуются с участием рецепторопосредованного каспазного, митохондриального (с активацией каспазы-9) и p53-зависимого пути ядерного механизмов апоптоза.

Ключевые «сайты» регулирования апоптоза лимфоцитов в условиях воздействия УФ-света и пероксида водорода в присутствии кофеина, генистеина, ресвератрола – системы генерации в клетках активных форм кислорода.

Ключевые слова: лимфоциты, апоптоз, УФ-свет, активные формы кислорода, пероксид водорода, механизмы, пути реализации

Выяснение закономерностей гибели клеток как фундаментального общебиологического явления — важнейшая 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 гомеоста-

за, биологического действия физико-химических агентов, патогенеза различных заболеваний организма и разработке эффективных методов их лечения.

Основными типами клеточной гибели считают некроз и типы запрограммированной смерти клеток (ПСК): апоптоз (ПСК I типа), аутофагию (ПСК II типа), некроз (ПСК III типа). Запрограммированность клеточной смерти обусловлена закономерной активацией специфических генов и синте-

зом соответствующих белков, ответственных за инициацию и осуществление внутриклеточных процессов, приводящих к уничтожению клетки. Программированная клеточная гибель включена в программу развития организма и реализуется на определенном этапе его жизнедеятельности и при нерепарируемых повреждениях клеток в условиях воздействия физико-химических факторов.

Накоплены обширные сведения о программированной смерти клетки I типа — апоптозе, его морфологических и биохимических признаках, механизмах и путях реализации, «основных участниках», регуляторах, роли в развитии патологических состояний [1-11].

Одним из индукторов апоптотической гибели различных типов клеток, в том числе, иммуноцитов, является УФ-излучение [12-19].

Апоптоз лимфоидных клеток может быть индуцирован УФ-облучением различных диапазонов длин волн: в основном УФВ (290-320 нм), УФС (200-290 нм), УФА1 (340-400 нм) [17]. Повреждение ядерной ДНК инициирует апоптоз в Т-клетках при псориазических поражениях путем активации p53 в условиях воздействия УФ-света (312 нм) в дозах 50-100 мДж/см² [16]. УФ-свет (290-320 нм, максимум при 310 нм) в дозах 1 и 10 мДж/см² активирует рецепторы смерти (Fas-рецепторы), экспрессирующиеся на поверхности лимфоидных клеток в ответ на активацию Fas-лигандов [15]. Вероятно, апоптоз иммунокомпетентных клеток осуществляется не только с участием CD95 (Fas/Apo-1)-рецепторно-лигандной системы, но и других путей [16, 18]. Так, УФ-свет (300-320 нм, максимум – 315 нм) в дозе 300 Дж/м² вызывает нарушение структуры митохондрий линии Т-клеток Jurkat и выход из них апоптогенных факторов (цитохрома c, фактора, индуцирующего апоптоз, — AIF) [18]. Нарушения структурно-функционального состояния митохондрий могут происходить непосредственно под воздействием УФ-излучения, через повреждение ДНК и активацию рецепторов смерти [17].

Результаты этих исследований указывают на возможность инициации в лимфоидных клетках в условиях УФ-облучения (в основном, УФВ-диапазона) рецепторного, митохондриального и ядерного (p53-зависимого пути) механизмов апоптоза. В то же время многие вопросы, касающиеся выявления динамики (последовательности) событий, приводящих к гибели иммунокомпетентных клеток, способов запуска различных механизмов и путей реализации апоптоза в условиях воздействия

УФ-излучения более широкого диапазона длин волн и доз, а также их медиаторов, остаются открытыми. Необходимо исследовать временные аспекты апоптоза как зависящего от времени процесса [20].

Исследования механизмов УФ-индуцированного апоптоза клеток крови человека представляются в настоящее время весьма актуальными в связи с пониманием необходимости усиления интереса ученых к проблеме изучения механизмов терапевтического действия метода аутотрансфузии УФ-облученной крови как альтернативного современным фармакологическим подходам метода лечения инфекций, нормализации показателей крови и иммуномодулирующей терапии [21].

В настоящее время сложилось представление о свободнорадикальном механизме инициации апоптоза в различных типах клеток [22-25]. Установлена взаимосвязь между образованием в клетках (или воздействием на клетки) активных форм кислорода (АФК) и активированных кислородных метаболитов (АКМ) и индукцией в них апоптоза. АФК участвуют в запуске апоптоза путем инициации митохондриального механизма, увеличения концентрации внутриклеточного кальция, образования цАМФ, окисления ДНК с последующей активацией p53, окисления фосфатидилсерина плазматической мембраны и инактивации скрамблазы, усиления фосфорилирования белков, приводящего к изменению регуляции экспрессии генов.

Наиболее стабильной из АФК – редокс-активных молекул – является пероксид водорода. В зависимости от концентрации пероксид водорода способен стимулировать пролиферацию, вызывать задержку роста клеток и индуцировать апоптоз. Окончательно не решены вопросы о концентрационной границе между сигнальным и токсическим действием пероксида водорода, а также основном пути гибели клеток в условиях оксидативного стресса.

В этой связи нами были 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/м² и активных форм кислорода (супероксидного анион-радикала, гидроксильного радикала, пероксида водорода, синглетного кислорода) [26-33].

В настоящем обзоре обобщены результаты исследования механизмов апоптоза лимфоцитов периферической крови человека, индуцирован-

ного воздействием УФ-излучения (240-390 нм) и активных форм кислорода.

БИОХИМИЧЕСКИЕ ПРИЗНАКИ АПОПТОЗА

Комплекс биохимических признаков апоптоза включает: повышение уровня и активности проапоптотических белков семейства Bcl-2, изменения структурно-функциональных свойств митохондрий и их компонентов, активацию в цитоплазме каспаз и других протеолитических ферментов, нарушение водно-солевого баланса цитоплазмы, изменения липидного состава и структурной асимметрии липидов плазматической мембраны, нарушения цитоскелета, активацию эндонуклеаз, появление двунитевых разрывов ДНК и межнуклеосомную фрагментацию ДНК с образованием фрагментов, кратных 180-200 п.н. [1-8].

Исследование УФ-индуцированных процессов фрагментации ДНК и структурной асимметрии липидов плазматических мембран лимфоцитов

Процесс фрагментации ДНК лимфоцитов, сопровождающийся образованием фрагментов с размерами – 6000 п.н., 5000 п.н. и менее 1500 п. н., обнаружен через 20 ч после УФ-облучения суспензии клеток в дозах 151, 1510 и 3020 Дж/м² [27, 28].

Одним из ранних маркеров апоптотических изменений в клетках является необратимая транслокация фосфатидилсерина плазматической мембраны на наружную поверхность липидного бислоя, которую исследуют методом проточной цитофлуориметрии. Нами выявлено [30], что через 6 ч после УФ-облучения лимфоцитов в дозе 1510 Дж/м² наблюдается значительный рост количества клеток, находящихся на поздней стадии апоптоза или некроза (66.3 %) по сравнению с таковым для контрольных образцов (1.6 %). Количество ранних апоптотических лимфоцитов возрастало с 7.9 до 17.8 %.

Обнаруженные процессы межнуклеосомной фрагментации ДНК и структурной асимметрии липидного бислоя плазматических мембран после воздействия на клетки УФ-излучения – одни из маркеров апоптотической гибели клеток.

Исследование р53-зависимого пути ядерного механизма апоптоза УФ-модифицированных лимфоцитов

С помощью метода ДНК-комет [27, 28] выявлено, что повреждения ДНК (однонитевые разрывы) обнаруживаются сразу после фотомодифи-

кации лимфоцитов в дозах 1510 и 3020 Дж/м² и достигают максимального уровня через 6 ч после УФ-облучения. Наиболее существенное возрастание степени поврежденности ДНК зарегистрировано через 6 ч после УФ-облучения лимфоцитов в дозе 1510 Дж/м². Вероятно, накопление однонитевых разрывов ДНК приводит в итоге к формированию двунитевых разрывов, являющихся сигналом к запуску апоптоза лимфоцитарных клеток.

При повреждениях ДНК возможна реализация р53-зависимого пути ядерного механизма апоптоза [1, 2, 8] по схеме: повреждения ДНК (двунитевые разрывы) → сенсор повреждений из семейства фосфатидилинозитол-3-киназ—белок ATM → фосфорилирование транскрипционного фактора р53 → экспрессия генов-активаторов апоптоза и репрессия антиапоптотических генов → запуск митохондриального механизма апоптоза с активацией каспаз → самоуничтожение клетки.

Используемый нами источник УФ-излучения содержит спектральные линии 253.7 и 265.2 нм, которые могут поглощаться азотистыми основаниями нуклеиновых кислот, вследствие чего происходят процессы фотоповреждения ДНК. Поэтому в условиях УФ-облучения возможна реализация ядерного механизма апоптоза лимфоцитов с участием транскрипционного фактора р53. Традиционные представления о роли р53 как индуктора апоптоза связаны с активацией его транскрипционных мишеней, в том числе Puma, Noxa, р21Cip1. В то же время р53 может активировать проапоптотические белки Вах и Вак на внешней мембране митохондрий, что приводит к индукции апоптоза, не зависящего от транскрипции. Активация Вах и Вак инициирует высвобождение цитохрома с из митохондрий и запуск митохондриального каспазного механизма [34].

УФ-облучение исследуемых клеток в дозе 151 Дж/м² не вызывало изменений уровня р53 в цитозоле по сравнению с таковым для интактных иммунных клеток [27, 28]. УФ-модификация лимфоцитов в дозах 1510 и 3020 Дж/м² приводила к статистически значимому возрастанию величины тестируемого параметра относительно контроля (нативные клетки) через 6 ч после облучения. Причем наблюдаемый эффект был наиболее ярко выражен после фотомодификации иммунных клеток в дозе 1510 Дж/м².

Полученные нами данные свидетельствуют в пользу представлений об участии р53-зависимого пути ядерного механизма апоптоза в процессах гибели лимфоцитов крови доноров, индуцированных воздействием УФ-света.

Исследование УФ-индуцированного рецепторопосредованного каспазного механизма апоптоза

Рецепторный (рецепторопосредованный) механизм апоптоза реализуется по схеме [2, 6-8]: проапоптотический лиганд смерти CD95L (мембранная форма) → рецептор смерти CD95 (Fas) в олигомерном (тримеризованном) состоянии → адаптер FADD → иницирующая прокаспаза -8 или -10 → активная каспаза -8 или -10 → эффекторная прокаспаза-3 → активная каспаза-3 → белки-мишени (в т.ч. ингибитор ДНКазы) → расщепление клеточных белков, активация ДНКазы и «разрезание» ДНК на фрагменты.

Нами установлено [26, 27], что в течение 1-5 ч после воздействия УФ-света в дозах 151, 1510, 3020 Дж/м² наблюдается повышение уровня экспрессии мембранных Fas-рецепторов (CD95) по сравнению с таковым для интактных клеток, обусловленное демаскированием в мембране ранее скрытых (предсуществующих) и синтезом новых молекул рецепторов смерти.

Индукция определенных стадий (фаз инициации и передачи сигнала) апоптоза и активация проапоптотических белков вызывают активацию каспаз — цистеиновых протеаз, расщепляющих внутриклеточные белки-мишени за остатком аспартата [6].

Обнаружено повышение функциональной активности эффекторной каспазы-3, расщепляющей комплекс ДНКазы (CAD) с ее ингибитором (ICAD), по отношению к контролю через 8, 24 ч и 6, 8 ч соответственно после УФ-облучения лимфоцитов в дозах 151 и 1510 Дж/м² [26, 27]. После УФ-модификации лимфоцитов в дозе 3020 Дж/м² и последующей инкубации клеток в течение 2, 4, 6 и 24 ч выявлено снижение уровня активности каспазы-3 по отношению к таковому контрольных образцов, что может быть связано с переключением каспазного рецепторного пути апоптоза с участием каспазы-3 на каспазозависимый путь, связанный с освобождением из митохондрий фактора, индуцирующего апоптоз (AIF), вызывающего конденсацию хроматина и разрыв ДНК. Так, возможность реализации каспазозависимого пути для линии Т-клеток человека Jurkat в присутствии ингибитора каспаз (z VAD-fmk) была продемонстрирована в условиях воздействия УФ-света (λ_{\max} = 315 нм) [18]. Эта спектральная линия присутствует и в спектре излучения применяемой нами лампы типа ДРТ-400, что позволяет предположить возможность инициации путей

УФ-индуцированного апоптоза (3020 Дж/м²) без участия каспаз.

Полученные результаты свидетельствуют в пользу представлений о реализации рецепторопосредованного каспазозависимого пути программированной клеточной гибели после воздействия на лимфоциты УФ-света в дозах 151 и 1510 Дж/м².

Сигнал от рецепторов смерти на ведущую эффекторную каспазу-3 передает иницирующая каспаза-8, которая выполняет регуляторную роль в рецепторзависимой передаче сигналов апоптоза [8, 35].

При исследовании изменений функциональной активности каспазы-8 лимфоцитов, модифицированных воздействием УФ-света в дозе 1510 Дж/м², установлено, что через 3 ч после УФ-облучения клеток наблюдается статистически достоверное повышение на 55 % уровня активности каспазы-8 по сравнению с таковым для немодифицированных лимфоцитов [31]. УФ-индуцированная активация каспазы-8 может быть связана с передачей сигнала от рецепторов смерти CD95, высвобождением катепсинов при повреждении лизосомальных мембран или участием церрамида в передаче апоптотического сигнала к каспазному каскаду [36, 37].

Активация иницирующей каспазы-8 после воздействия УФ-света на лимфоциты, по всей вероятности, вызывает повышение активности эффекторной каспазы-3 через 6 и 8 ч после фотомодификации клеток. В то же время активация каспазы-3 может быть связана также с активацией других иницирующих каспаз, в частности, каспазы-9.

Исследование митохондриального механизма апоптоза УФ-модифицированных лимфоцитов

Митохондриальный механизм апоптоза реализуется по схеме: индукторы апоптоза → увеличение проницаемости внутренней митохондриальной мембраны и снижение мембранного потенциала → образование (открытие) пор (каналов) в митохондриальной мембране с участием проапоптотических белков семейства Bcl-2 (Bax, Bak, Bad и др.) → высвобождение из межмембранного пространства митохондрий в цитоплазму апоптотических факторов (цитохрома с, прокаспаз -2, -3, -9, эндонуклеазы G и фактора, индуцирующего апоптоз, — AIF) → образование в цитоплазме апоптосомы с участием цитохрома с, цитоплазматического фактора APAF-1, иницирующей прокаспазы-9 и АТФ → активная каспаза-9 → прокаспазы -3, -6, -7 → активация эффекторных каспаз -3, -6, -7 → расщепление белков-мишеней и фрагментация ДНК [3, 6, 8].

Увеличение внутриклеточной концентрации цитохрома с по отношению к контролю зарегистрировано через 1,5 ч после УФ-облучения лимфоцитов лишь в дозе 151 Дж/м² [27].

При исследовании изменений уровня активности каспазы-9 через 1 час после УФ-облучения клеток в дозе 1510 Дж/м² нами не были обнаружены статистически достоверные отличия уровня каспазы-9 от такового для интактных клеток.

При исследовании опосредованного каспазой-8 апоптоза в условиях УФ-облучения клеток тимусной лимфомы мыши было обнаружено высвобождение цитохрома с из митохондрий без активации каспазы-9 [38]. УФ-индуцированный процесс секвестрации каспазы-9 зависит от состояния цитоскелета, а внутриклеточное распределение протеинов Bcl-x1, Araf-1 и белков цитоскелета рассматривается как существенный фактор в регулировании процессов апоптоза.

По-видимому, процесс УФ-индуцированной клеточной гибели лимфоцитов возможен и без участия каспазы-9.

Исследование возможной роли медиаторов апоптоза – активных форм кислорода и ионов кальция – в процессах реализации УФ-индуцированной клеточной смерти лимфоцитов

Один из маркеров инициации митохондриального механизма апоптоза – увеличение внутриклеточной концентрации активных форм кислорода.

В пользу представлений о возможности запуска митохондриального механизма апоптоза свидетельствуют данные по определению уровня активных форм кислорода в УФ-облученных лимфоцитах. Выявлено [33], что УФ-облучение (1510 Дж/м²) иммуноцитов и их последующая инкубация в течение 1 и 2 ч индуцировали повышение внутриклеточного уровня активных форм кислорода по сравнению с таковым для контрольных образцов. Известно [22], что индукция апоптотической гибели может быть сопряжена с активацией свободнорадикального окисления и/или с недостаточностью системы антиоксидантов, т.е. наблюдается в условиях окислительного стресса. Воздействие УФВ-диапазона (280-320 нм) на клетки индуцирует образование фотопродуктов и активных форм кислорода, развитие окислительного стресса [39]. УФ-радиация подавляет пути выведения АФК, способствуя их продукции при апоптозе, опосредованном митохондриями [40].

Один из вариантов внутриклеточных событий апоптоза с участием АФК может развиваться так: активация р53 → редокс-фермент р66 → образова-

ние пероксида водорода и других активных форм кислорода в митохондриях → открытие каналов в митохондриальной мембране → запуск митохондриального механизма апоптоза. АФК способствуют активации редоксчувствительных систем регуляции апоптоза: митогенактивируемых протеинкиназ — JNK и р38, которые инициируют апоптоз с участием транскрипционных факторов р53 и NF-κB [41]. АФК, вызывая окислительное повреждение ДНК, инициируют запуск р53-зависимого пути ядерного механизма апоптоза.

Лимфоциты сразу реагируют на действие УФ-света (1510 Дж/м²) путем значительного повышения внутриклеточной концентрации АФК. В ответ на повышение содержания АФК в клетке мобилизуются ферменты антиоксидантной защиты. Обнаружено [33], что через 2 ч после УФ-облучения лимфоцитов наблюдается статистически достоверное повышение по отношению к контролю (нативные иммуноциты) ферментативной активности глутатионредуктазы, восстанавливающей окисленный глутатион, и снижение — каталазы, расщепляющей пероксид водорода, соответственно.

Возможно, обнаруженное нами падение активности каталазы в ходе реализации УФ-индуцированного апоптоза лимфоцитов приводит к нарастанию уровня H₂O₂ – регулятора открывания пор в мембранах митохондрий («депо» проапоптотических факторов) — и способствует усилению процессов программированной клеточной смерти иммуноцитов. Косвенным подтверждением процессов модификации внутренней митохондриальной мембраны является снижение на 20 % по сравнению с контролем (100 %) уровня активности сукцинатдегидрогеназы митохондрий через 2 ч после УФ-облучения лимфоцитов [30].

Еще одним подтверждением возможности участия АФК в процессах реализации апоптоза лимфоцитов являются результаты экспериментов с использованием кофеина (10⁻⁴ моль/л) и генистеина (10⁻⁶ моль/л), способных проявлять антиапоптотический эффект путем снижения уровня активных форм кислорода в интактных и УФ-облученных лимфоцитах и инактивации пероксида водорода [33]. Добавление этих агентов к УФ-облученным лимфоцитам индуцировало снижение по сравнению с контролем количества клеток, находящихся на ранней стадии апоптоза.

Помимо активных форм кислорода, еще одним эндогенным активатором апоптоза являются ионы кальция.

При исследовании изменений уровня кальция в цитозоле клеток после их облучения в дозе 1510 Дж/м² выявлено значительное повышение уровня внутриклеточного кальция по сравнению с таковым для интактных клеток [42]. Увеличение [Ca²⁺] в интактных и УФ-модифицированных клетках по сравнению с уровнем исследуемого параметра в норме может быть связано с выходом ионов кальция в цитозоль из депо (эндоплазматический ретикулум, митохондрий) и поступлением их из среды в клетки через кальциевые каналы плазматических мембран. При УФ-облучении клеток вход ионов кальция из среды в клетку может осуществляться вследствие повышения проницаемости липидного бислоя мембран, индуцированного пероксидным фотоокислением липидов (ПФОЛ) и темновым пероксидным окислением липидов (ПОЛ). Повышение уровня ионов кальция в условиях воздействия УФС и УФВ-излучения, зависящее от дозы, осуществляется в основном за счет притока внеклеточного кальция, более выражено в Т-клетках, может достигать 240 и 180 % от концентрации кальция в интактных иммунocyтах (130 нмоль/л) [43]. Кальциевые каналы в мембранах лимфоцитов чувствительны к воздействию УФ-света [21].

Обнаружено статистически значимое снижение по отношению к контролю интенсивности флуоресценции «митохондриального» флуоресцентного зонда родамина 123 для УФ-облученных клеток, что является показателем нарушения функционального состояния митохондрий, связанного с уменьшением их мембранного потенциала [30].

Выявление таких маркерных показателей митохондриального механизма апоптоза, как увеличение уровня активных форм кислорода и изменение активности антиоксидантных ферментов в цитозоле, рост концентрации ионизированного кальция, изменения величины активности маркерного фермента митохондрий – сукцинатдегидрогеназы, уменьшение мембранного потенциала митохондрий, указывают на участие митохондрий и их компонентов в реализации УФ-индуцированной программированной смерти клеток I типа.

Исследование процессов фрагментации ДНК и структурной асимметрии липидов плазматических мембран клеток после воздействия активных форм кислорода

Процесс фрагментации ДНК обнаружен через 20 ч после воздействия на лимфоциты супероксидного анион-радикала, синглетного кислорода, гидроксильного радикала и пероксида водорода [27]. Размеры фрагментов ДНК клеток, модифи-

цированных воздействием O₂^{•-}, ¹O₂, OH[•], H₂O₂, варьируют соответственно в пределах 2500 – 5000 п. н., 1500 - 2500 п. н., 2000-4500 п. н., 1500-4000 п. н. Образование крупных фрагментов ДНК указывает на возможность инициации путей реализации апоптоза с участием транскрипционного фактора p53, проапоптозного фактора Вах и митохондриального фактора А1F.

При проведении проточно-цитометрического анализа лимфоцитов, модифицированных воздействием ¹O₂ и H₂O₂, выявлено [32], что через 6 часов инкубации в Ca²⁺-содержащей среде количество клеток, находящихся на ранней стадии апоптоза, составило соответственно 20.9 и 9.1 %, в то время как в «бескальциевой» среде — 6.2 и 1.6 % (для сравнения в контроле через 6 ч в кальций-содержащей среде — 7.9 %, в «бескальциевой» среде — 2.4 %). Следовательно, наличие кальция в среде суспендирования лимфоцитов в условиях воздействия синглетного кислорода и пероксида водорода ускоряет процессы реализации апоптотической гибели клеток. Это может быть связано с наличием в лимфоцитарных мембранах кальций-чувствительного рецептора (CaSR), связанного с G-белком, и играющего важную роль в процессах клеточной дифференцировки, пролиферации, апоптоза, секреции цитокинов [44].

Исследование p53-зависимого пути ядерного механизма апоптоза в условиях воздействия пероксида водорода

При исследовании уровня поврежденности ДНК клеток после воздействия наиболее стабильной из активных форм кислорода – пероксида водорода (10⁻⁶ моль/л), выявлены кометы класса С1, через 6 и 20 ч инкубации модифицированных клеток соответственно – комет С2/С3 и С3/С4 классов [27, 28]. Апоптоз клеток в условиях воздействия H₂O₂ происходит через промежуточное состояние С1 с образованием высокомолекулярных фрагментов ДНК (> 300 т.п.н.) и состояние С2, характеризующееся наличием фрагментов ДНК (≤ 50 т.п.н.). Для части клеток после воздействия H₂O₂ на них возможен переход апоптоза в некроз.

Существенное повышение по сравнению с контролем уровня поврежденности ДНК зарегистрировано сразу и через 6 ч (максимальный объем повреждений) после воздействия на суспензию клеток пероксида водорода (10⁻⁶ моль/л) [27, 28].

Добавление к суспензии клеток пероксида водорода в конечной концентрации 10⁻⁶ моль/л вызывало статистически достоверное повышение

концентрации р53 по сравнению с интактными клетками [27, 28].

Полученные результаты указывают на реализацию р53-зависимого пути ядерного механизма апоптоза клеток в условиях воздействия активных форм кислорода.

Исследование рецепторопосредованного каспазного механизма апоптоза в условиях воздействия активных форм кислорода

Показано [27, 28], что в течение 1-5 ч после воздействия на лимфоциты активных форм кислорода (супероксидного анион-радикала, пероксида водорода, гидроксильного радикала, синглетного кислорода) наблюдается повышение уровня экспрессии мембранных рецепторов смерти (CD95) по сравнению с таковым для интактных клеток.

С использованием проточно-цитометрического метода установлено, что пероксид водорода в конечной концентрации 10^{-5} моль/л вызывает увеличение уровня экспрессии CD95 лимфоцитов через 1 ч на 17 % и через 2 ч на 76 % по сравнению с таковым для контрольных образцов.

Обнаружено статистически достоверное повышение уровня активности эффекторной каспазы-3 по сравнению с контролем после 2-х и 4-х часов инкубации лимфоцитов, модифицированных воздействием H_2O_2 в концентрации 10^{-6} моль/л [27, 28].

Сразу после модификации клеток H_2O_2 (10^{-6} моль/л) нами выявлено повышение на 25 % уровня активности иницирующей каспазы-8 по сравнению с таковым для немодифицированных лимфоцитов [31].

Полученные результаты свидетельствуют в пользу представлений о реализации рецепторопосредованного каспазного механизма реализации апоптоза в условиях генерации активных форм кислорода.

Исследование митохондриального механизма апоптоза в условиях воздействия активных форм кислорода

Нами обнаружено существенное повышение (в 2,6 раза) по сравнению с контролем (интактные клетки) активности иницирующей каспазы-9, участвующей в запуске митохондриального каспазного пути апоптоза через 1 и 2 ч после воздействия H_2O_2 (10^{-5} моль/л) [45]. Каспаза-9 далее активирует эффекторную каспазу-3, расщепляющую белки-мишени.

Выявлено статистически значимое повышение уровня внутриклеточных активных форм кислорода через 1 и 2 ч после модификации клеток

H_2O_2 (10^{-5} моль/л) по сравнению с таковым для интактных образцов [45]. Стимуляция образования активных кислородных метаболитов в клетках в условиях воздействия индуцирующих активных форм кислорода называется феноменом АФК-индуцированного образования АФК. Небольшие количества индуцирующих АФК вызывают падение трансмембранного потенциала митохондрий и генерацию вторичных активных форм кислорода, что приводит к развитию «окислительного взрыва». В ходе АФК-индуцированного образования АФК происходит окисление белков и регуляторных тиолов, которые изменяют редокс-статус клеток, иницируя неспецифическую проницаемость мембран митохондрий: происходит нарушение функционирования электрон-транспортной цепи и изменение свойств митохондриальной мембраны.

Выявлено защитное действие трансресвератрола (Shaanxi Hongao Bio-Tech Inc., Китай) в концентрации 10^{-6} моль/л по отношению к уровню жизнеспособности лимфоцитов после воздействия пероксида водорода (10^{-5} моль/л). Предварительная инкубация лимфоцитов с ресвератролом индуцировала снижение на 37 и 47 % уровня АФК в цитозоле модифицированных H_2O_2 и интактных клеток соответственно по отношению к таковому для иммуноцитов в отсутствие ресвератрола. С помощью метода хемиллюминисценции в модельной системе обнаружена антирадикальная активность ресвератрола по отношению к пероксиду водорода. Следовательно, ресвератрол является регулятором процессов апоптотической гибели лимфоцитов, связанных с воздействием экзогенного пероксида водорода и интенсификацией образования активных кислородных метаболитов [45].

Воздействие пероксида водорода в той же концентрации на клетки индуцировало сначала повышение уровня цитозольного кальция до 150 ± 18 нмоль/л по отношению к таковому для интактных клеток (81 ± 15 нмоль/л); через 1 и 3 часа – снижение соответственно до 45 ± 8 и 34 ± 10 нмоль/л по сравнению с таковым для нативных образцов (67 ± 10 и 59 ± 8 нмоль/л) [45]. Возможно, в клетках в этих условиях происходят процессы перераспределения ионов кальция между клеточными компартментами – цитозолем, митохондриями и ядром. Захват цитозольного кальция митохондриями способствует инициации митохондриального механизма апоптоза.

Увеличение концентрации кальция в цитозоле

может индуцировать запуск путей апоптоза, реализующихся с участием инициирующей каспазы-12, а также протеинкиназы С. Ca^{2+} необходим для активации Ca^{2+} , Mg^{2+} -зависимой эндонуклеазы, катализирующей процессы фрагментации ДНК.

Обнаружено статистически значимое снижение на 32 % интенсивности флуоресценции «митохондриального» флуоресцентного зонда – родамина 123 – по сравнению с таковой для нативных клеток (100 %) для клеток через 1 ч после модификации пероксидом водорода, что является показателем нарушения функционального состояния митохондрий [45].

Активация инициирующей каспазы-9, увеличение концентрации в цитоплазме активных форм кислорода, нарушение мембранного потенциала митохондрий, изменения уровня цитозольного кальция после воздействия на клетки пероксида водорода (10^{-5} моль/л) являются маркерами митохондриального механизма апоптоза, реализующегося с участием каспазы-9.

Нами выявлено, что экзогенный пероксид водорода в конечной концентрации 1 и 10 мкмоль индуцирует в лимфоцитах процессы апоптотической гибели, которые реализуются с участием рецепторопосредованного каспазного, митохондриального (с активацией каспазы-9) и р53-зависимого пути ядерного механизмов апоптоза. Причем митохондриальный механизм с участием каспазы-9 является «быстродействующим», а его медиаторы – активные формы кислорода и ионы кальция. Следовательно, системы генерации активных форм кислорода и пути перераспределения свободных ионов кальция между клеточными компартментами могут выступать в качестве «чувствительных центров» регулирования H_2O_2 -индуцированного апоптоза. Вероятно, структурно-функциональные модификации лимфоцитов под влиянием АФК вносят определенный вклад в реализацию последовательности внутриклеточных событий, приводящих к программированной клеточной смерти иммуноцитов в условиях воздействия УФ-света.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Обобщая полученные результаты, можно заключить, что программированная клеточная гибель лимфоцитов, индуцированная УФ-светом в широком диапазоне длин волн (240-390 нм) в дозе 1510 Дж/м², реализуется с участием р53-зависимого пути ядерного механизма, а также рецепторопосредованного каспазного, митохондри-

ального и связанного с нарушением кальциевого гомеостаза механизмов. При этой дозе облучения по сравнению с другими использованными нами дозами «апоптотические эффекты» выражены наиболее ярко.

Медиаторами УФ-индуцированного (1510 Дж/м²) апоптоза являются активные формы кислорода и ионы кальция, уровень которых существенно нарастает сразу после облучения. Изменения структурно-функционального состояния лимфоцитов, индуцированные воздействием активных форм кислорода, могут вносить существенный вклад в реализацию последовательности внутриклеточных событий, приводящих к программированной клеточной смерти I типа в условиях воздействия УФ-света.

Наиболее вероятно, «быстродействующие» пути реализации апоптоза при облучении – митохондриальный (как результат генерации АФК) и связанный с нарушением кальциевого гомеостаза («кальций-зависимые»). «Долгосрочные» механизмы – рецепторный каспазный и ядерный. Усилителями (триггерами) митохондриального механизма апоптоза являются «кальций-зависимый» и ядерный (р53-зависимый путь). Митохондриальный механизм в то же время является «долгосрочным» (как результат реализации р53-зависимого пути), а вероятность его реализации, по-видимому, увеличивается в течение определенных периодов апоптотической гибели клеток в облученной суспензии. Ключевые («узловые») точки быстрого регулирования УФ-индуцированного апоптоза – это системы генерации активных форм кислорода и перераспределения ионов кальция между клеточными компартментами.

Программированная гибель лимфоцитов, индуцированная воздействием УФ-света (240-390 нм) в дозе 151 Дж/м², осуществляется с участием рецепторопосредованного каспазного и ядерного механизмов апоптоза. Не исключена возможность участия цитохрома с в процессах клеточной смерти при этой дозе облучения. Доза облучения 151 Дж/м² соответствует «терапевтической» дозе УФ-света, а спектральные линии применяемой нами лампы ДРТ-400 — 253.7, 302.2, 312.6, 365 нм — спектральным линиям источников УФ-излучения в аппарате для облучения крови «Изольда»: 254, 308, 313, 365 нм, а также в аппарате «SOLARIS» для внутривенного облучения крови: 365 нм. В этой связи необходимо учитывать полученные результаты при изучении молекулярно-клеточных эффектов метода аутоотрансфузии УФ-облученной

крови (АУФОК-терапии). Можно предположить, что возможность осуществления процессов апоптоза лимфоцитов в условиях УФ-облучения крови будет полезна при лечении аутоиммунных патологий, возникающих при недостаточной элиминации аутореактивных лимфоцитов, а также при вирусных заболеваниях, вызванных вирусами, ингибирующими апоптоз.

Апоптоз лимфоцитов в условиях воздействия УФ-света в дозе 3020 Дж/м² связан с запуском р53-зависимого пути ядерного и рецепторопосредованного механизмов без участия каспазы-3.

Инициация апоптоза лимфоцитов в условиях воздействия УФ-излучения обусловлена процессами, индуцируемыми фотохимическими превращениями компонентов биомембран и ДНК клеток. В целом, последовательность возможных внутриклеточных событий, приводящих к апоптотической гибели лимфоцитов после их УФ-облучения, может быть представлена схемой (рис. 1).

Фотоиндуцированная активация рецепторов смерти (Fas-рецепторов) может вызывать образование кластеров Fas-рецепторов на поверхности клеток независимо от активации Fas-лиганда [46]. При этом происходит образование тримеров Fas-рецепторов и дальнейшее преобразование апоптотического сигнала с участием цитоплазматических факторов.

УФ-свет с длинами волн 253.7 и 265.2 нм способен поглощаться азотистыми основаниями нуклеиновых кислот. Повреждения ДНК (одно- и двуниевые разрывы) после УФ-облучения клеток индуцируют запуск р53-зависимого пути ядерного механизма апоптоза, связанного с рецепторопосредованным и митохондриальным механизмами [47-49]. Р53 влияет на митохондриальный механизм апоптоза путем репрессии транскрипции антиапоптозного белка Bcl-2 и активации транскрипции проапоптозных белков: Вах [50], Noxa [51, 34], p53AIP1 [52], Puma [53, 54, 34], APAF-1 [55, 56, 57], а также р53-индуцируемых генов PIG3, PIG8 [60], FDXR [61], функция которых связана с изменением редокс-баланса клетки. Резкое повышение уровня внутриклеточных кислородных радикалов, происходящее при индукции данной группы генов, может способствовать ускорению клеточной смерти [62]. Регулирование белком р53 рецепторопосредованного механизма апоптоза проявляется путем повышения чувствительности клеток к внешним проапоптозным факторам, стимулирования транскрипции генов Fas (APO-1) [58] и KILLER/DR5 [59]. Следовательно, определив соотношение концентраций названных проапоптозных и антиапоптозных белков, можно судить о степени (глубине) апоптоза исследуемых клеток.

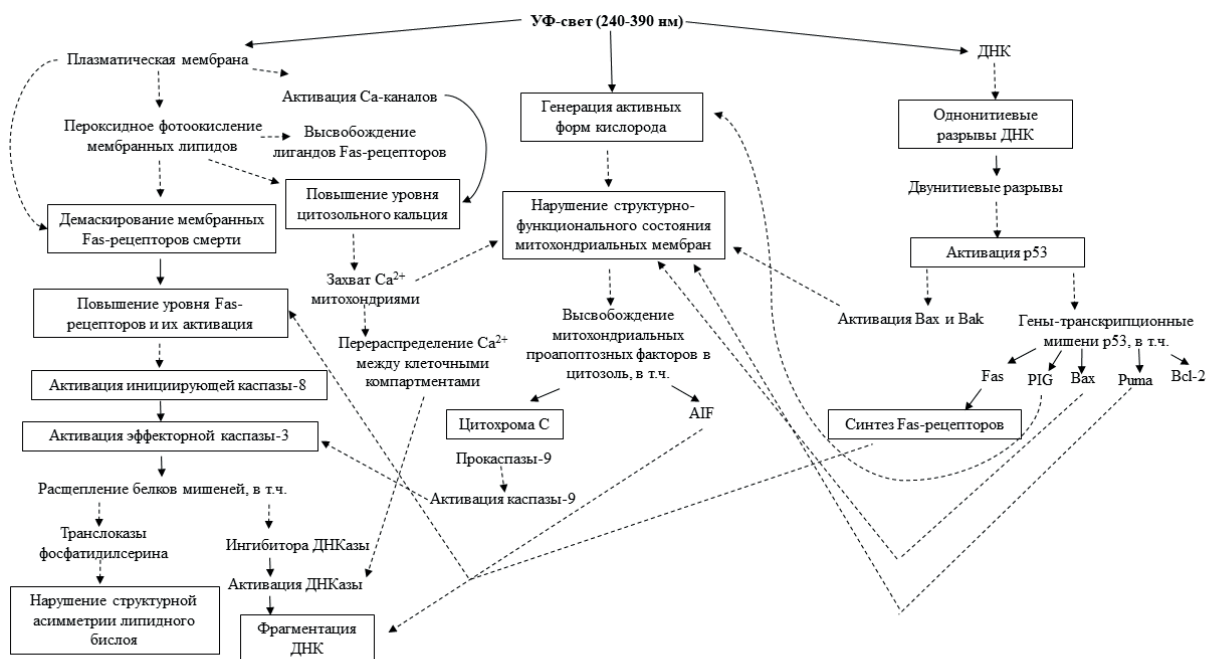


Рис. 1. Схема возможных внутриклеточных событий, приводящих к апоптотической гибели клеток после их УФ-облучения: -----> – через промежуточные стадии, □ – результаты собственных исследований

Приведенные в обзоре результаты развивают и конкретизируют современные представления о механизмах реализации процессов программированной клеточной смерти лимфоцитов человека в условиях воздействия УФ-света и активных форм кислорода для решения различных задач биологии и медицины.

Работа выполнена при поддержке Министерства науки и высшего образования РФ в рамках государственного задания ВУЗам в сфере научной деятельности на 2023-2025 годы, проект № FZGU-2023-0009.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Kumar S. // *Methods in molecular biology*. 2004. Vol. 282, pp. 19–30.
2. Elmore S. // *Toxicologic Pathology*. 2007. Vol. 35, No 4, pp. 495–516.
3. Scoranno L. // *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. 2009. Vol. 41, pp. 1875–1883.
4. Portt L., Norman G., Clapp C., Greenwood M., Greenwood M. T. // *Biochim. Biophys. Acta (BBA). Molecular Cell Research*. 2011. Vol. 1813. No1, pp. 238–259.
5. Creagh E.M. // *Trends in Immunology*. 2014. Vol. 35, No 12, pp. 631–640.
6. Mc Ilwain D.R., Berger T., Mak T.W. // *Cold Spring Harbor perspectives in biology*. 2013. Vol. 5, No 4, pp. 1–28.
7. Shalini S., Dorstyn L., Dawar S., Kumar S. // *Cell death and differentiation*. 2015. Vol. 22, No. 4, pp. 526–539.
8. Green D.R., Llambi F. *Cell death signaling // Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2015.
9. Favaloro B., Allocati N., Graziano V., Dillio C., De Laurenzi V. // *Aging*. 2012. Vol. 4. No 5, pp. 330-349.
10. Singh R., Letai A., Sarosiek K. // *Nature reviews Molecular cell biology*. 2019. Vol. 20, pp. 175-193.
11. Ulukay E., Acilan C., Yilmaz Y. // *Cell Biochem Funct*. 2011. Vol. 29, pp. 468-480.
12. Servomaa K., Rytomaa T. // *Photodermatol. Photoimmunol. Photomed*. 1990. Vol. 57. No 2, pp. 331–343.
13. Martin S.J., Gotter T.G. // *Int. J. Radiat. Biol*. 1991. Vol. 59. No 4, pp. 1001-1016.
14. Abe M., Ishikawa O., Miyachi Y., Kanai Y. // *Photodermatol. Photoimmunol. Photomed*. 1997. Vol. 13, No 5-6, pp. 204–207.
15. Caricchio R., Reap E.A., Cohen P.L. // *The Journal of Immunology*. 1998. Vol.161, pp.241-251.
16. Ozawa B.M., Ferenczi K., Kikuchi T., Cardinale I., Austin L.M., Coven T.R., Burack L.H., Krueger J.G. // *Exp. Med*. 1999. Vol. 189. No 4, pp. 711-718.
17. Kulms D., Schwarz T. // *Photodermatol. Photoimmunol. Photomed*. 2000. Vol. 16, pp. 195–201.
18. Murahashi H., Azuma H., Zamzami N., Furuya K., Ikebuchi K., Yamaguchi M., Yamada Y., Sato N., Fujihara M., Kroemer G., Ikeda H. // *Journal of Leukocyte Biology*. 2003. Vol. 73, pp. 399-406.
19. Deng H., Yan Ch.L., Hu Yu., Xu Yu., Liao K.H. // *Photodermatol. Photoimmunol. Photomed*. 2004. Vol. 20. No 4, pp. 191–199.
20. Banfali G. // *Apoptosis*. 2017. Vol. 22 (2), pp. 306-323.
21. Wu X., Hu X., Hamblin M. R. // *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. 2016. Vol. 157, pp. 89–96.
22. Mates J.M., Sanchez-Jimenez F.M. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. 2000. Vol. 32, No 2, pp. 157-170.
23. Riazantseva N.V., Novitskiĭ V.V., Chasovskikh N.Iu., Kaigorodova E.V., Starikova E.G., Starikov Iu. V., Radzivil T. T., Krat N.V. // *Tsitologiya*. 2009. Vol. 51. No 4, pp. 329-334.
24. Cherenkevich S.N., Martinovich G.G., Martinovich I.V., Gorudko I.V., Shamova E.V. / *Vesci NAN Belarusi. Ser. biyal. Navuk*. 2013. Vol. 1, pp. 92–108.
25. Nadeev A.D., Zinchenko V.P., Kudryavtsev I.V., Serebriakova M.K., Avdonin P.V., Goncharov N.V. // *Cell and Tissue Biology*. 2015. Vol. 57. No 12, pp. 909-916.
26. Артюхов В.Г., Трубицына М.С., Наквасина М.А., Соловьева Е.В., Лидохова О.В. // *Радиационная биология. Радиоэкология*. 2011. Т. 51. № 4. С. 425-443.
27. Artyukhov V.G., Trubicina M.S., Nakvasina M.A., Solovieva E.V. // *Cell and Tissue Biology*. 2011. Vol. 5. No 2, pp. 61-67.
28. Nakvasina M.A., Trubicina M.S., Solovieva E.V., Artyukhov V.G. // *Biophysics*. 2012. Vol. 57. No 4. pp. 477-484.
29. Артюхов В.Г., Трубицына М.С., Наквасина М.А., Лидохова О.В., Рязанцев С.В. // *Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии*. 2013. № 7. С. 7-16.
30. Наквасина М.А., Лидохова О.В., Доманская Т.Л., Артюхов В.Г., Рязанцев С.В. // *Радиационная биология. Радиоэкология*. 2015. Т. 55. № 6. С. 616-624.
31. Наквасина М.А., Токмакова Е.В., Ефремова Д.С., Артюхов В.Г. // *Радиационная биология*.

Радиоэкология. 2018. Т. 58. № 5. С. 511-516.

32. Nakvasina M.A., Popova L.I., Artyukhov V.G., Lidokhova O.V. // Bull. Exp. Biol. Med. 2019. Vol. 166. No 4, pp. 481-486.

33. Nakvasina M.A., Tokmakova E.V., Koltakov I.A., Artyukhov V.G. // Biology Bulletin. 2020. Vol. 47, No 11, pp. 1547-1551.

34. Wickremasinghe R.G., Prentice A.G., Steele A.J. // Leukemia. 2011. Vol. 25. No 9, pp. 1400-14007.

35. Julien O., Wells I.A. // Cell Death and Differentiation. Advance online publication. 2017.

36. Appelqvist H., Wäster P., Eriksson I., Rosdahl I., Ollinger K. // J. Cell Sci. 2013. Vol. 126, pp. 5578-5584.

37. Scoltock A.B., Cidlowski J.A. // Exp. Cell. Res. 2004. Vol. 297 (1), pp. 212-223.

38. Okamoto M., Koga S., Tatsuka M. // Mutation Research. Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis. 2010. Vol. 688. No 1-2, pp. 78-87.

39. Salucci S., Burattini S., Curzi D., Buontempo F., Martelli A. M., Zappia G., Falcieri E., Battistelli M. // Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology. 2014. Vol. 141, pp. 1-9.

40. Park G., Kim H.G., Hong S.P., Kim S.Y., Oh M.S. // Skin. Pharmacol. Physiol. 2014. Vol. 27. No 3, pp. 132-140.

41. Baines C.P., Molkenin J.D. // J. Mol. Cell. Cardiol. 2005. Vol. 38. No 1, pp. 47-62.

42. Наквасина М.А., Артюхов В.Г., Радченко М.С., Тищенко А.И. // Организация и регуляция физиолого-биохимических процессов: межрегиональный сборник научных работ. Воронеж, 2020. Вып. 22. С. 130-139.

43. Spielberg H., June C.H., Blair O.C., Nystrom-Rosander C., Cereb N., Deeg H.J. // Experimental hematology. 1991. Vol. 19. No 8, pp. 742-748.

44. Wu C., Wu Q., Du J., Zeng J., Li T., Xu C., Sun Y. // Molecular Immunology. 2015. Vol. 62. No 2, pp. 337-342.

45. Наквасина М.А., Артюхов В.Г., Старикова Т.И., Сараджи Н.Г. // Актуальные вопросы биологической физики и химии. 2022. Т. 7. № 3. С. 440-445.

46. Aragane Y., Kulms D., Metze D., Wilkes G., Röppelmann B., Luger T.A., Schwarz T. // J. Cell. Biol. 1998. Vol. 140. No 1, pp. 171-182.

47. Vousden K. H. // Cell. 2000. Vol. 103. No 5, pp. 691-694.

48. Vousden K. H., Lu X. // Nat. Rev. Cancer. 2002. Vol.2. No 8, pp. 594-604.

49. Gottlieb T. M., Oren M. // Semin. Cancer Biol. 1998. Vol. 8. No 5, pp. 359-368.

50. Miyashita T., Reed J.C. // Cell. 1995. Vol. 80. No 2, pp. 293-299.

51. Oda E., Ohki R., Murasawa H., Nemoto J., Shibue T., Yamashita T., Tokino T., Taniguchi T., Tanaka N. // Science. 2000. Vol. 288, pp. 1053-1058.

52. Oda K., Arakawa H., Tanaka T., Matsuda K., Tanikawa C., Mori T., Nishimori H., Tamai K., Tokino T., Nakamura Y., Taya Y. // Cell. 2000. Vol. 102. No 6, pp. 849-862.

53. Nakano K., Vousden K.H. // Mol. Cell. 2001. Vol. 7. No 3, pp. 683-694.

54. Yu J., Zhang L., Hwang P.M., Kinzler K.W., Vogelstein B. // Mol. Cell. 2001. Vol. 7. No 3, pp. 673-682.

55. Fortin A., Cregan S.P., MacLaurin J. G., Kushwaha N., Hickman E.S., Thompson C.S., Hakim A., Albert P.R., Cecconi F., Helin K., Park D.S., Slack R.S. // J. Cell Biol. 2001. Vol. 155. No 2, pp. 207-216.

56. Moroni M.C., Hickman E.S., Lazzerini Denchi E., Caprara G., Colli E., Cecconi F., Muller H., Helin K. // Nat. Cell Biol. 2001. Vol. 3. No 6, pp. 552-558.

57. Robles A.I., Bemmels N.A., Foraker A.B., Harris C.C. // Cancer Res. 2001. Vol. 61. No 18, pp. 6660-6664.

58. Owen-Schaub L.B., Zhang W., Cusack J.C., Angelo L.S., Santee S.M., Fujiwara T., Roth J.A., Deisseroth A.B., Zhang W.W., Kruzel E., Radinsky R. // Mol. Cell Biol. 1995. Vol. 15. No 6, pp. 3032-3040.

59. Wu G.S., Burns T.F., McDonald E.R., Jiang W., Meng R., Krantz I.D., Kao G., Gan D.D., Zhou J.Y., Muschel R., Hamilton S.R., Spinner N.B., Markowitz S., Wu G., el-Deiry W.S. // Nat. Genet. 1997. Vol. 17. No 2, pp. 141-143.

60. Polyak K., Xia Y., Zweier J. L., Kinzler K.W., Vogelstein B. // Nature. 1997. Vol. 389, pp. 300-305.

61. Hwang P. M., Bunz F., Yu J., Rago C., Chan T.A., Murphy M.P., Kelso G.F., Smith R.A., Kinzler K.W., Vogelstein B. // Nat. Med. 2001. Vol. 7. No 10, pp. 1111-1117.

62. Vladimirov Yu. A. // Membrane and Cell Biol. 1998. Vol.12, No 5, pp. 645-663.

Воронежский государственный университет

**Наквасина М. А., доктор биологических наук, профессор кафедры биофизики и биотехнологии
E-mail: nakvasina_ma@mail.ru*

Voronezh State University

*Nakvasina M. A., PhD., DSci., Professor of the Department of Biophysics and Biotechnology
E-mail: nakvasina_ma@mail.ru*

Наквасина М. А., Артюхов В. Г., Свекло Л. С.

Артюхов В. Г., доктор биологических наук, заслуженный деятель науки РФ, заведующий кафедрой биофизики и биотехнологии

E-mail: artyukhov@bio.vsu.ru

Artyukhov V. G., PhD., DSci., Honored Scientist of the Russian Federation, Head of the Department of Biophysics and Biotechnology,

E-mail: artyukhov@bio.vsu.ru

БСМП ВО «Воронежская областная станция переливания крови»

Свекло Л. С., доктор медицинских наук, заведующая филиалом

E-mail: sveklo@mail.ru

BSMP Branch of the Voronezh Regional Blood Transfusion Station

Sveklo L. S., MD, Head of the Regional Blood Transfusion Station

E-mail: sveklo@mail.ru

MECHANISMS OF UV-INDUCED DEATH OF HUMAN LYMPHOCYTES AND ACTIVE OXYGEN SPECIES

M. A. Nakvasina¹, V. G. Artyukhov¹, L. S. Sveklo²

¹Voronezh State University

²Branch of BSMP VO "Voronezh Regional Blood Transfusion Station"

Abstract. The review summarizes the results of a study of marker indicators (indicators) of various pathways and mechanisms for the implementation of apoptosis of peripheral blood lymphocytes of donors induced by exposure to UV light (240-390 nm) at doses of 151, 1510, 3020 J/m² and reactive oxygen species (hydrogen peroxide, superoxide anion radical, hydroxyl radical, singlet oxygen). The processes of DNA fragmentation, violations of the structural asymmetry of plasma membranes and the structural and functional state of mitochondrial membranes, changes in the level of DNA damage (single-strand breaks), transcription factor p53, cytochrome c, death receptors Fas (CD95), caspase-3, -8, -9, reactive oxygen species, calcium ions in modified cells were studied. It has been established that the programmed cell death of lymphocytes after UV irradiation at a dose of 1510 J/m² is carried out with the participation of the p53-dependent pathway of the nuclear mechanism, as well as receptor-mediated caspase, mitochondrial and calcium homeostasis-related mechanisms, and its mediators are reactive oxygen species and ions calcium. A scheme of possible intracellular events leading to apoptotic cell death after UV irradiation has been proposed. Issues related to the possibility of implementing "fast-acting" and "long-term" mechanisms of UV-induced apoptosis of lymphocytes are discussed. Issues related to the possibility of implementing "fast-acting" and "long-term" mechanisms of UV-induced apoptosis of lymphocytes are discussed. Most likely, "fast-acting" pathways for the implementation of apoptosis during irradiation: mitochondrial as a result of the generation of reactive oxygen species and associated with impaired calcium homeostasis ("calcium-dependent"). "Long-term" mechanisms are receptor caspase and nuclear. Amplifiers (triggers) of the mitochondrial mechanism of apoptosis are "calcium-dependent" and nuclear (p53-dependent pathway). At the same time, the mitochondrial mechanism is "long-term" as a result of the implementation of the p53-dependent pathway.

It was found that exogenous hydrogen peroxide at a final concentration of 1 and 10 μ mol induces apoptotic death processes in lymphocytes, which are realized with the participation of receptor-mediated caspase, mitochondrial (with caspase-9 activation), and p53-dependent pathways of the nuclear mechanisms of apoptosis. The key "sites" for regulating apoptosis of lymphocytes under exposure to UV light and hydrogen peroxide in the presence of caffeine, genistein, and resveratrol are the systems for generating reactive oxygen species in cells.

Keywords: lymphocytes, apoptosis, UV light, reactive oxygen species, hydrogen peroxide, mechanisms, pathways

REFERENCES

1. Kumar S., Methods in molecular biology, 2004, Vol. 282, pp. 19–30. DOI: 10.1385/1-59259-812-9:019
2. Elmore S., Toxicologic Pathology, 2007, Vol. 35, No 4, pp. 495–516.
3. Scoranno L., The International Journal of Biochemistry & Cell Biology, 2009, Vol. 41, pp. 1875–1883. DOI: 10.1016/j.biocel.2009.04.016
4. Portt L., Norman G., Clapp C., Greenwood M., Greenwood M. T., Biochim. Biophys. Acta (BBA).

- Molecular Cell Research, 2011, Vol. 1813, No1, pp. 238–259. DOI: 10.1016/j.bbamcr.2010/10/010
5. Creagh E.M., Trends in Immunology, 2014, Vol. 35, No 12, pp. 631–640. DOI: 10.1016/j.it.2014.10.004
 6. Mc Ilwain D.R., Berger T., Mak T.W., Cold Spring Harbor perspectives in biology, 2013, Vol. 5, No 4, pp. 1–28. DOI: 10.1101/cshperspect.a008656
 7. Shalini S., Dorstyn L., Dawar S., Kumar S., Cell death and differentiation, 2015, Vol. 22, No 4, pp. 526–539. DOI: 10.1038/cdd.2014.216
 8. Green D.R., Llambi F., Cold Spring Harb Perspect Biol., 2015, DOI: 10.1101/cshperspect.a006080
 9. Favaloro B., Allocati N., Graziano V., Dillio C., De Laurenzi V., Aging, 2012, Vol. 4, No 5, pp. 330-349. DOI: 10.18632/aging.100459
 10. Singh R., Letai A., Sarosiek K., Nature reviews Molecular cell biology, 2019, Vol. 20, pp. 175-193. DOI: 10.1038/s41580-018-0089-8
 11. Ulukay E., Acilan C., Yilmaz Y., Cell Biochem Funct., 2011, Vol. 29, pp. 468-480. DOI: 10.1002/cbf.1774
 12. Servomaa K., Rytomaa T., Photodermatol. Photoimmunol. Photomed., 1990, Vol. 57, No 2, pp. 331–343. DOI: 10.1080/09553009014552441
 13. Martin S.J., Gotter T.G., Int. J. Radiat. Biol., 1991, Vol. 59, No 4, pp. 1001-1016. DOI: 10.1080/09553009114550891
 14. Abe M., Ishikawa O., Miyachi Y., Kanai Y., Photodermatol. Photoimmunol. Photomed., 1997, Vol. 13, No 5-6, pp. 204–207. DOI: 10.1111/j.1600-0781.1997.tb00232.x
 15. Caricchio R., Reap E.A., Cohen P.L., The Journal of Immunology, 1998, Vol.161, pp.241–251. DOI: 10.4049/j.immunol.161.1.241
 16. Ozawa B.M., Ferenczi K., Kikuchi T., Cardinale I., Austin L.M., Coven T.R., Burack L.H., Krueger J.G., Exp. Med., 1999, Vol. 189, No 4, pp. 711-718. DOI: 10.1084/jem.189.4.711
 17. Kulms D., Schwarz T., Photodermatol. Photoimmunol. Photomed., 2000, Vol. 16, pp. 195–201.
 18. Murahashi H., Azuma H., Zamzami N., Furuya K., Ikebuchi K., Yamaguchi M., Yamada Y., Sato N., Fujihara M., Kroemer G. and Ikeda H., Journal of Leukocyte Biology, 2003, Vol. 73, pp. 399-406. DOI: 10.1189/jlb.0702335
 19. Deng H., Yan Ch.L., Hu Yu., Xu Yu., Liao K.H., Photodermatol. Photoimmunol. Photomed., 2004, Vol.20, No4, pp. 191–199. DOI: 10.1111/j.1600-0781.2004.00099.x.
 20. Banfali G., Apoptosis, 2017, Vol. 22 (2), pp. 306-323. DOI: 10.1007/s10495-016-1333-3
 21. Wu X., Hu X., Hamblin M. R., Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology, 2016, Vol. 157, pp. 89–96. DOI: 10.1007/978-3-319-56017-5_25
 22. Mates J.M., Sanchez-Jimenez F.M. The International Journal of Biochemistry & Cell Biology, 2000, Vol. 32, No 2, pp. 157-170. DOI: 10.1016/s1357-2725(99)00088-6
 23. Riazantseva N.V., Novitskiĭ V.V., Chasovskikh N.Iu., Kaĭgorodova E.V., Starikova E.G., Starikov Iu. V., Radzivil T. T., Krat N.V., Tsitologiya, 2009, Vol. 51, No 4, pp. 329-334. DOI: 10.1134/S1990519X09040014
 24. Cherenkevich S.N., Martinovich G.G., Martinovich I.V., Gorudko I.V., Shamova E.V., Vesci NAN Belarusi. Ser. biyal. Navuk, 2013, Vol. 1, pp. 92–108.
 25. Nadeev A.D., Zinchenko V.P., Kudryavtsev I.V., Serebriakova M.K., Avdonin P.V., Goncharov N.V., Cell and Tissue Biology, 2015, Vol. 57, No 12, pp. 909-916. DOI: 10.1134/S1990519X16020097.
 26. Artjuhov V.G., Trubicyna M.S., Nakvasina M.A., Solov'eva E.V., Lidohova O.V., Radiacionnaja biologija. Radiojekologija, 2011, T. 51, № 4, S. 425-443.
 27. Artyukhov V.G., Trubicina M.S., Nakvasina M.A., Solovieva E.V., Cell and Tissue Biology, 2011, Vol. 5, No 2, pp. 61-67. DOI: 10.1134/S1990519X11020039
 28. Nakvasina M.A., Trubicina M.S., Solovieva E.V., Artyukhov V.G., Biophysics, 2012, Vol. 57, No 4, pp. 477-484. DOI: 10.1134/S0006350912040124
 29. Artjuhov V.G., Trubicyna M.S., Nakvasina M.A., Lidohova O.V., Rjazancev S.V., Voprosy biologicheskoy, medicinskoj i farmacevticheskoy himii, 2013, № 7, S. 7-16.
 30. Nakvasina M.A., Lidohova O.V., Domanskaja T.L., Artjuhov V.G., Rjazancev S.V., Radiacionnaja biologija. Radiojekologija, 2015, T. 55, № 6, S. 616-624. DOI: 10.7868/S0869803115060089
 31. Nakvasina M.A., Tokmakova E.V., Efremova D.S., Artjuhov V.G., Radiacionnaja biologija. Radiojekologija, 2018, T. 58, № 5, S. 511-516. DOI: 10.1134/S0869803118050132
 32. Nakvasina M.A., Popova L.I., Artyukhov V.G., Lidokhova O.V., Bull. Exp. Biol. Med., 2019, Vol. 166, No 4, pp. 481-486. DOI: 10.1007/S10517-019-04377-4
 33. Nakvasina M.A., Tokmakova E.V., Koltakov I.A., Artyukhov V.G., Biology Bulletin, 2020, Vol. 47, No 11, pp. 1547-1551. DOI: 10.1134/S1062359020110114

34. Wickremasinghe R.G., Prentice A.G., Steele A.J., *Leukemia*, 2011, Vol. 25, No 9, pp. 1400-14007. DOI: 10.1038/leu.2011.103
35. Julien O., Wells I.A., *Cell Death and Differentiation*. Advance online publication, 2017, DOI: 10.1038/cdd.2017.44
36. Appelqvist H., Wäster P., Eriksson I., Rosdahl I., Ollinger K., *J. Cell Sci.*, 2013, Vol. 126, pp. 5578-5584. DOI: 10.1242/jcs.130633
37. Scoltock A.B., Cidlowski J.A., *Exp. Cell Res.*, 2004, Vol. 297 (1), pp. 212-223. DOI: 10.1016/j.yexcr.2004.03.025
38. Okamoto M., Koga S., Tatsuka M., *Mutation Research. Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 2010, Vol. 688, No 1-2, pp. 78-87. DOI: 10.1016/j.mrfmmm.2010.03.012
39. Salucci S., Burattini S., Curzi D., Buontempo F., Martelli A. M., Zappia G., Falcieri E., Battistelli M., *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 2014, Vol. 141, pp. 1-9. DOI: 10.1016/j.jphotobiol.2014.09.004
40. Park G., Kim H.G., Hong S.P., Kim S.Y., Oh M.S., *Skin. Pharmacol. Physiol.*, 2014, Vol. 27, No 3, pp. 132-140. DOI: 10.1159/000354917
41. Baines C.P., Molkentin J.D., *J. Mol. Cell. Cardiol.*, 2005, Vol. 38, No 1, pp. 47-62. DOI: 10.1016/j.yjmcc.2004.11.004
42. Nakvasina M.A., Artjuhov V.G., Radchenko M.S., Tishhenko A.I., *Organizacija i reguljacija fiziologo-biohimicheskikh processov: mezhregional'nyj sbornik nauchnyh rabot, Voronezh*, 2020, Vyp. 22, S. 130-139.
43. Spielberg H., June C.H., Blair O.C., Nystrom-Rosander C., Cereb N., Deeg H.J., *Experimental hematology*, 1991, Vol. 19, No 8, pp. 742-748.
44. Wu C., Wu Q., Du J., Zeng J., Li T., Xu C., Sun Y., *Molecular Immunology*, 2015, Vol. 62, No 2, pp. 337-342. DOI: 10.1016/j.molimm.2014.08.007
45. Nakvasina M.A., Artjuhov V.G., Starikova T.I., Saradzhi N.G., *Aktual'nye voprosy biologicheskoy fiziki i himii*, 2022, T. 7, № 3, S. 440-445.
46. Aragane Y., Kulms D., Metze D., Wilkes G., Pöppelmann B., Luger T.A., Schwarz T., *J. Cell. Biol.*, 1998, Vol. 140, No 1, pp. 171-182. DOI: 10.1083/jcb.140.1.171
47. Vousden K. H., *Cell.*, 2000, Vol. 103, No 5, pp. 691-694. DOI: 10.1016/s0092-8674(00)00171-9
48. Vousden K. H., Lu X., *Nat. Rev. Cancer.*, 2002, Vol.2, No 8, pp. 594-604. DOI: 10.1038/nrc864
49. Gottlieb T. M., Oren M., *Semin. Cancer Biol.*, 1998, Vol. 8, No 5, pp. 359-368. DOI: 10.1006/scbi.1998.0098
50. Miyashita T., Reed J.C., *Cell.*, 1995, Vol. 80, No 2, pp. 293-299. DOI: 10.1016/0092-8674(95)90412-3
51. Oda E., Ohki R., Murasawa H., Nemoto J., Shibue T., Yamashita T., Tokino T., Taniguchi T., Tanaka N., *Science*, 2000, Vol. 288, pp. 1053-1058. DOI: 10.1126/science.288.5468.1053
52. Oda K., Arakawa H., Tanaka T., Matsuda K., Tanikawa C., Mori T., Nishimori H., Tamai K., Tokino T., Nakamura Y., Taya Y., *Cell.*, 2000, Vol. 102, No 6, pp. 849-862. DOI: 10.1016/s0092-8674(00)00073-8
53. Nakano K., Vousden K.H., *Mol. Cell.*, 2001, Vol. 7, No 3, pp. 683-694. DOI: 10.1016/s1097-2765(01)00214-3
54. Yu J., Zhang L., Hwang P.M., Kinzler K.W., Vogelstein B., *Mol. Cell.*, 2001, Vol. 7, No 3, pp. 673-682. DOI: 10.1016/s1097-2765(01)00213-1
55. Fortin A., Cregan S.P., MacLaurin J. G., Kushwaha N., Hickman E.S., Thompson C.S., Hakim A., Albert P.R., Cecconi F., Helin K., Park D.S., Slack R.S., *J. Cell Biol.*, 2001, Vol. 155, No 2, pp. 207-216. DOI: 10.1083/jcb.200105137
56. Moroni M.C., Hickman E.S., Lazzerini Denchi E., Caprara G., Colli E., Cecconi F., Muller H., Helin K., *Nat. Cell Biol.*, 2001, Vol. 3, No 6, pp. 552-558. DOI: 10.1038/35078527
57. Robles A.I., Bemmels N.A., Foraker A.B., Harris C.C., *Cancer Res.*, 2001, Vol. 61, No 18, pp. 6660-6664.
58. Owen-Schaub L.B., Zhang W., Cusack J.C., Angelo L.S., Santee S.M., Fujiwara T., Roth J.A., Deisseroth A.B., Zhang W.W., Kruzel E., Radinsky R., *Mol. Cell Biol.*, 1995, Vol. 15, No 6, pp. 3032-3040. DOI: 10.1128/MCB.15.6.3032
59. Wu G.S., Burns T.F., McDonald E.R., Jiang W., Meng R., Krantz I.D., Kao G., Gan D.D., Zhou J.Y., Muschel R., Hamilton S.R., Spinner N.B., Markowitz S., Wu G., el-Deiry W.S., *Nat. Genet.*, 1997, Vol. 17, No 2, pp. 141-143. DOI: 10.1038/ng1097-141
60. Polyak K., Xia Y., Zweier J. L., Kinzler K.W., Vogelstein B., *Nature*, 1997, Vol. 389, pp. 300-305. DOI: 10.1038/38525
61. Hwang P. M., Bunz F., Yu J., Rago C., Chan T.A., Murphy M.P., Kelso G.F., Smith R.A., Kinzler K.W., Vogelstein B., *Nat. Med.*, 2001, Vol. 7, No 10, pp. 1111-1117. DOI: 10.1038/nm1001-1111
62. Vladimirov Yu. A., *Membrane and Cell Biol.*, 1998, Vol.12, No 5, pp. 645-663.