

**ФРАГМЕНТАЦИЯ ДНК ЛИМФОЦИТОВ ЧЕЛОВЕКА
В ДИНАМИКЕ РАЗВИТИЯ АПОПТОЗА, ИНДУЦИРОВАННОГО ВОЗДЕЙСТВИЕМ
УФ-ИЗЛУЧЕНИЯ И АКТИВНЫХ ФОРМ КИСЛОРОДА**

© В. Г. Артюхов,¹ М. С. Трубицына, М. А. Наквасина, Е. В. Соловьева

Кафедра биофизики и биотехнологии Воронежского государственного университета;

¹ электронный адрес: avg@mail.vsu.ru

Установлено, что ультрафиолетовый (УФ) свет (240—390 нм) в дозах 151, 1510 и 3020 Дж/м², активные формы кислорода (АФК) и синглетный кислород индуцируют фрагментацию ДНК лимфоцитарных клеток человека через 20 ч после воздействия. С использованием метода ДНК-комет выявлено, что повреждения ДНК (однонитевые разрывы) обнаруживаются сразу после УФ-облучения лимфоцитов в дозах 1510 и 3020 Дж/м² или добавления пероксида водорода в концентрации 10⁻⁶ моль/л (кометы типа С1) и достигают максимума через 6 ч после воздействия на клетки УФ-света или АФК (кометы типов С2 и С3). Выдвинуто предположение о ведущей роли p53-зависимого пути в реализации апоптоза лимфоцитов человека в условиях воздействия УФ-света и АФК.

Ключевые слова: лимфоциты, ДНК-кометы, апоптоз, УФ-свет, активные формы кислорода.

В организме здорового человека клеточный гомеостаз определяется балансом между гибеллю и пролиферацией клеток. Апоптоз — программированная клеточная гибель, энергетически зависимый, генетически контролируемый процесс, который запускается специфическими сигналами и избавляет организм от поврежденных или ослабленных клеток (Владимирская, 2002). Жизнеспособность клеток зависит от соотношения активаторов и ингибиторов апоптоза. В роли ингибиторов апоптоза могут выступать факторы роста, клеточный матрикс и половые стероиды. К активаторам апоптоза относятся глюкокортикоиды, некоторые вирусы, активные формы кислорода (АФК), ультрафиолетовый (УФ) свет, ионизирующая радиация, а также генотоксические и канцерогенные вещества (Скулачев, 2001).

Конечным этапом реализации программы апоптоза является деградация ДНК на фрагменты, кратные 180—200 парам нуклеотидов (п. н.), что приводит к образованию характерной картины (лесенки) на электрофорограмме клеточных ДНК-экстрактов. Однако последняя дает информацию, усредненную по всей популяции исследуемых клеток (Тронов, Пелевина, 1996).

Существует метод, позволяющий наблюдать изменения в хроматине клетки на ранних этапах развития апоптоза, а также различать клетки, погибающие по механизму апоптоза и некроза, — метод ДНК-комет (Ostling, Johanson, 1984). Это — способ регистрации повреждений генома индивидуальной клетки, который в настоящее время применяется при проведении эпидемиологических и генотоксических обследований, при диагностике, лечении и профилактике заболеваний (Сирота, Кузнецова, 2008).

К настоящему времени установлено, что УФ-свет, АФК и синглетный кислород являются потенциальными

индукторами апоптоза в клетках различных типов, в том числе иммунокомпетентных (Servomaa, Rytoma, 1990; Martin, Gotter, 1991; Лонская и др., 1997; Меньщикова, Зенков, 1997; Плетнюшкина и др., 2006). Однако динамику процессов апоптоза, вызванного УФ-светом в дозах 151, 1510 и 3020 Дж/м², АФК и синглетного кислорода не исследовали.

В настоящей работе при помощи методов ДНК-комет и электрофореза в агарозном геле исследованы изменения структуры ДНК лимфоцитов периферической крови доноров после воздействия УФ-излучения, АФК и синглетного кислорода.

Материал и методика

Объектом исследования явились лимфоциты, полученные путем центрифугирования гепаринизированной донорской крови в градиенте плотности фикколл-урографина ($\rho = 1.077 \text{ г/см}^3$). Суспензию клеток инкубировали в среде RPMI-1640 (Биолот, Россия) при 37 °C в атмосфере 5 % CO₂.

Клетки облучали УФ-светом сверху с помощью ртутно-кварцевой лампы типа ДРТ-400 при их непрерывном перемешивании в термостатируемой стеклянной кювете (при 20 ± 1 °C). Расстояние от оси лампы до кюветы с клетками составляло 23 см. Облучение лимфоцитов (1 мл, 2 · 10⁶ кл./мл) проводили через светофильтр УФС-1 с полосой пропускания 240—390 нм (со спектральными линиями 253.7, 265.2, 280, 296.7, 302.2, 312.6 и 365 нм). Интенсивность излучения лампы — 151 Дж/м² за 1 мин. Использовали дозы 151, 1510 и 3020 Дж/м² при времени облучения соответственно 1, 10 и 20 мин. Плотность энергии излучения (облученность), создаваемую УФ-лу-

чами, измеряли с помощью уфиметра, смонтированного на кафедре биофизики Воронежского государственного университета. В качестве теплового приемника УФ-излучения в уфиметре применяли термобатарею, собранную из 50 никромово-константановых термопар (Рвачев, 1966).

Использовали системы экзогенной генерации разных АФК и синглетного кислорода (${}^1\text{O}_2$). Гидроксильные радикалы (OH^\cdot) генерировали с помощью реакции Фентона: к 0.9 мл суспензии лимфоцитов (1—2 млн/мл) прибавляли 0.05 мл свежеприготовленного раствора FeSO_4 ($5 \cdot 10^{-5}$ моль/л) и инкубировали 10 мин при комнатной температуре. Далее добавляли 0.05 мл 0.02%-ного H_2O_2 (Goldstein, Czapski, 1984).

Для генерации супероксидного анион-радикала (O_2^\cdot) в лимфоцитарную суспензию (1—2 млн/мл) объемом 0.9 мл вносили по 0.05 мл растворов рибофлавина ($1.3 \cdot 10^{-4}$ моль/л) и ТЕМЕД (0.1 моль/л, приготовлен на растворе ЭДТА 0.002 моль/л). Одновременно систему облучали в течение 1 мин светом лампы накаливания (мощность 60 Вт при расстоянии 10 см до кюветы с клетками) (Чумаков, Осинская, 1977). Для изучения влияния H_2O_2 в суспензии лимфоцитов (1—2 млн/мл) объемом 0.9 мл прибавляли 0.1 мл H_2O_2 (10^{-5} моль/л; концентрацию определяли спектрофотометрически с использованием коэффициента молярной экстинкции 43.6 $\text{l} \cdot \text{моль}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$ при 240 нм).

Для генерации ${}^1\text{O}_2$ 0.9 мл суспензии лимфоцитов (1—2 млн/мл) облучали в присутствии метиленового голубого (10^{-6} моль/л) красным светом с помощью устройства «Улокс», изготовленного по лазерной технологии на основе трехкомпонентного твердого раствора галлия, мышьяка и алюминия (Воронежский филиал Государственной научно-производственной фирмы Микротек): длина волны максимума излучения — 665 ± 15 нм, диапазон излучения — 630—700 нм, выходная интенсивность излучения — 20 мВт/см² (Миронов, 1996).

Результаты анализа изменений люминолзависимой хемилюминесценции показали, что уровень образования АФК в используемых нами системах их генерации был в среднем в 3—4 раза ниже уровня нейтрофилов при дыхательном взрыве. Известно, что во время дыхательного взрыва 10^7 нейтрофилов образуют 0.1 нмоль/мин O_2^\cdot (Curnutte, Babior, 1974), 10^6 нейтрофилов образуют 3—5 нмоль/мин H_2O_2 (Roos, 1980), 191 ± 22 нмоль/ч OH^\cdot (Neil et al., 1986) и 11.3 ± 4.9 нмоль ${}^1\text{O}_2/1.25 \cdot 10^6$ клеток (Steinbeck et al., 1992).

Выделение ДНК из лимфоцитов проводили при помощи фенольного метода (Дудник и др., 2001). Изменения структуры ДНК анализировали с помощью электрофореза в агарозном геле (Дудник и др., 2001). Размеры фрагментов ДНК лимфоцитарных клеток при проведении электрофореза в агарозном геле определяли с помощью MassRuler™ ДНК-маркера, который представляет собой набор из 9 ДНК-фрагментов длиной 1500, 2000, 2500, 3000, 4000, 5000, 6000, 8000 и 10 000 п. н.

Об индукции апоптоза лимфоцитов судили по методу ДНК-комет. Использовали щелочную обработку препаратов лизированных клеток, которая вызывает расщепление дуплекса ДНК и позволяет отдельным нитям независимо мигрировать в электрическом поле (Singh et al., 1988). Суть метода заключается в том, что ДНК единичных клеток, иммобилизованных в агарозе, подвергается электрофорезу, при этом фрагментированная ДНК выходит из ядра клетки, образуя «хвост» кометы. После окраски бро-

мистым этидием ДНК-кометы анализировали с помощью флуоресцентного микроскопа (Zeiss, фильтр возбуждения 450—490, дихронное зеркало FT 510, запирающий фильтр LP 520, объектив 40×). Изображения регистрировали цифровым фотоаппаратом Samsung S760. Сканирование комет проводили при помощи программы CometScore™.

В работе использовали следующие реагенты: фиккол 400 (Dia-m, Швейцария), урографин 76 % (Schering AG, Испания), ТЕМЕД, рибофлавин, пероксид водорода, метиленовый голубой и сульфат железа (Alfa Aesar, Германия), MassRuler™ ДНК-маркер и легкоплавкую агарозу (Fermentas, США).

Обработку результатов проводили с помощью пакета статистических программ Statgraphics. Определяли среднее значение, стандартное отклонение и доверительный интервал. Достоверность различий контрольных и экспериментальных результатов оценивали при помощи *t*-критерия Стьюдента.

Результаты

Для выявления возможного процесса фрагментации ДНК после воздействия на лимфоциты периферической крови доноров УФ-света в дозах 151, 1510 и 3020 Дж/м² мы выделяли ДНК из лимфоцитов при помощи фенольного метода и проводили электрофорез полученных препаратов ДНК интактных клеток и после УФ-облучения. Из анализа данных, представленных на рис. 1, следует, что на дорожке 1 (контроль) выявляется одна полоса, харак-

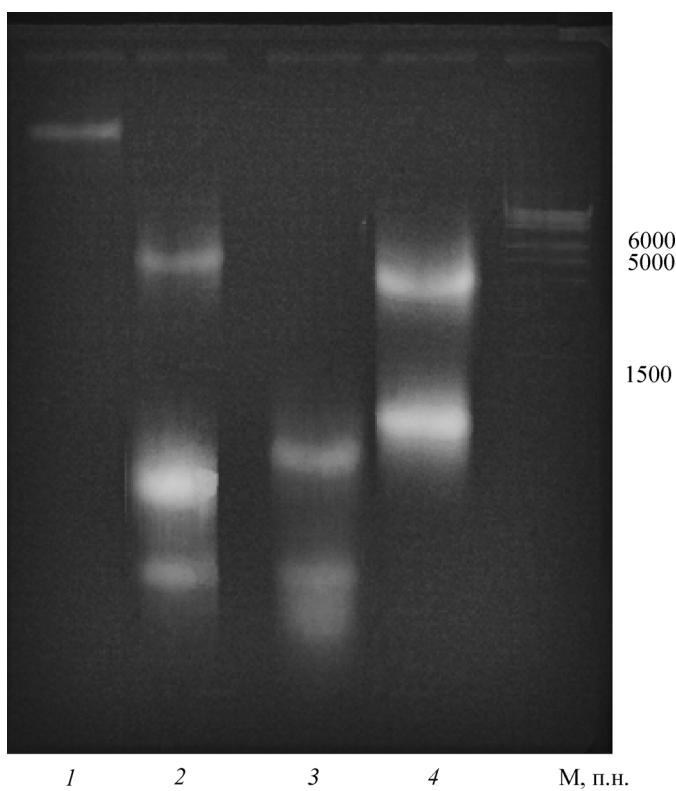


Рис. 1. Электрофорограмма ДНК лимфоцитов человека, облученных УФ-светом.
Дорожки: 1 — контроль; 2—4 — дозы облучения соответственно 151, 1510 и 3020 Дж/м²; М — маркер молекулярных масс, п. н.

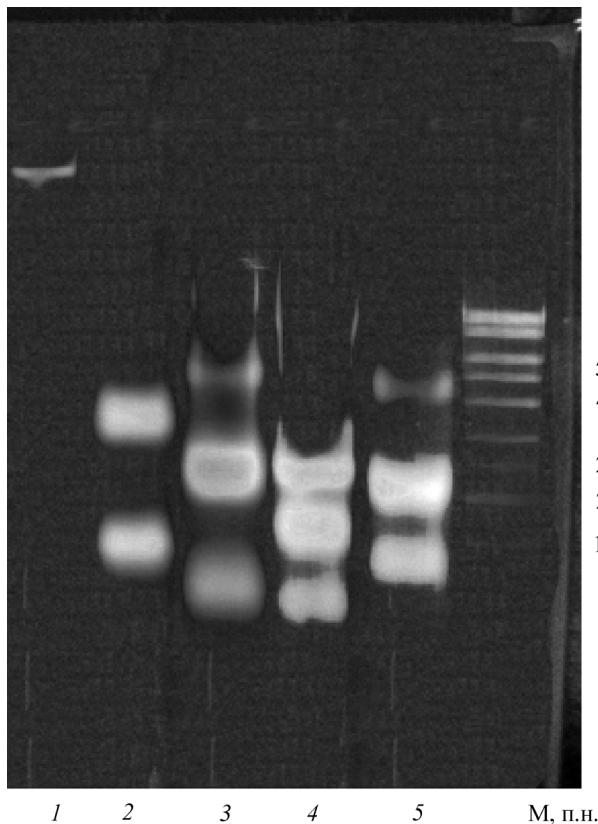


Рис. 2. Электрофорограмма ДНК лимфоцитов после действия активных форм кислорода.

Дорожки: 1 — контроль; 2 — 10^{-6} моль/л H_2O_2 ; 3 — супероксидный анион-радикал; 4 — синглетный кислород; 5 — гидроксильный радикал; М — маркер молекулярных масс, п. н.

терная для высокомолекулярной ДНК интактных клеток. Спустя 20 ч после УФ-облучения в вышеуказанных дозах на электрофорограмме обнаружены фрагменты ДНК (апоптотическая лестница), соответствующие размерам 6000, 5000 и менее 1500 п. н. (рис. 1, дорожки 2—4). Следовательно, УФ-свет в использованных дозах индуцирует апоптотическую гибель лимфоцитов человека.

Спустя 20 ч после воздействия на лимфоциты O_2^+ , ${}^1\text{O}_2$, OH^\bullet и H_2O_2 происходит фрагментация ДНК, на что указывает совокупность полос на электрофорограмме (рис. 2). Размеры фрагментов варьируют соответственно в пределах 2500—5000, 1500—2500, 2000—4500 и 1500—4000 п. н. Таким образом, УФ-свет (240—390 нм) в дозах 151, 1510 и 3020 Дж/м², АФК и синглетный кислород индуцируют апоптоз лимфоцитов человека. Фрагменты ДНК при воздействии на лимфоциты АФК и ${}^1\text{O}_2$ крупнее фрагментов, обнаруженных после УФ-облучения клеток в дозах 151 и 1510 Дж/м². Как и в случае с результатами УФ-облучения после воздействия на лимфоциты АФК и ${}^1\text{O}_2$, также можно предположить инициацию апоптоза, реализующегося с участием транскрипционного фактора p53, проапоптозного белка Bax и митохондриального апоптотического фактора AIF.

При помощи метода ДНК-комет исследовали уровень повреждения ДНК лимфоцитов после воздействия УФ-излучения (151, 1510 и 3020 Дж/м²) и H_2O_2 (10^{-6} моль/л). Известно, что ДНК-кометы классифицируют на пять типов в зависимости от степени повреждений ДНК: С0 (ДНК интактных клеток), С1 (фрагменты ДНК

размером > 300 т. п. н.), С2 (фрагменты ≤ 50 т. п. н.), С3 ($N \times 180$ п. н.), С4 (деградация генома и экскреция низкopolимерной ДНК из клетки) (Collins et al., 1995; Тронов и др., 1998). На рис. 3 и 4 представлены микрофотографии типов комет, формируемых лимфоцитами сразу и через 6 и 20 ч после УФ-облучения или действия H_2O_2 .

Кометы интактных лимфоцитов, инкубированных в среде RPMI-1640 в течение 6 и 20 ч, относятся к классу С0 (рис. 3, а). Кометы лимфоцитов непосредственно после воздействия УФ-света в дозе 151 Дж/м² относятся к классу С1. Спустя 6 и 20 ч после облучения иммуноцитов обнаружены кометы класса С2, характерные для предапоптотических клеток (коммитированных к гибели) с фрагментами ДНК ≤ 50 тыс. п. н. (рис. 3, б). После воздействия на лимфоциты УФ-света в дозе 1510 Дж/м² наблюдали образование комет класса С1, а через 6 и 20 ч после облучения — комет соответствующие классов С2 и С3 (рис. 3, в). Кометы класса С3 соответствуют апоптотическим с межнуклеосомной фрагментацией ДНК ($N \times 180$ п. н.).

После облучения лимфоцитов в дозе 3020 Дж/м² были обнаружены кометы класса С2, а через 6 и 20 ч после облучения — кометы класса С3 (рис. 3, г). Спустя 20 ч после УФ-облучения в указанной дозе выявлялись кометы класса С4. Наличие в исследуемых образцах комет класса С4 указывает на реализацию гибели части лимфоцитов по типу некроза. Сразу после добавления к лимфоцитам 10^{-6} моль/л H_2O_2 наблюдали образование комет класса С1, спустя 6 ч — комет классов С2 и С3, а через 20 ч — комет

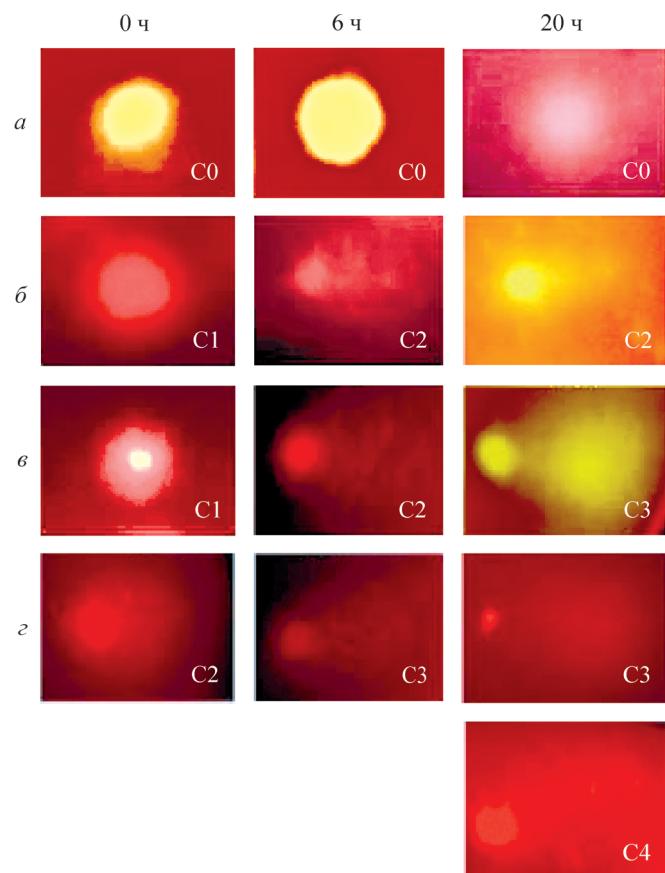


Рис. 3. Микрофотографии ДНК-комет сразу после УФ-облучения (0 ч) и через 6 и 20 ч после него.

а — интактные клетки; б — дозы облучения соответственно 151, 1510 и 3020 Дж/м².

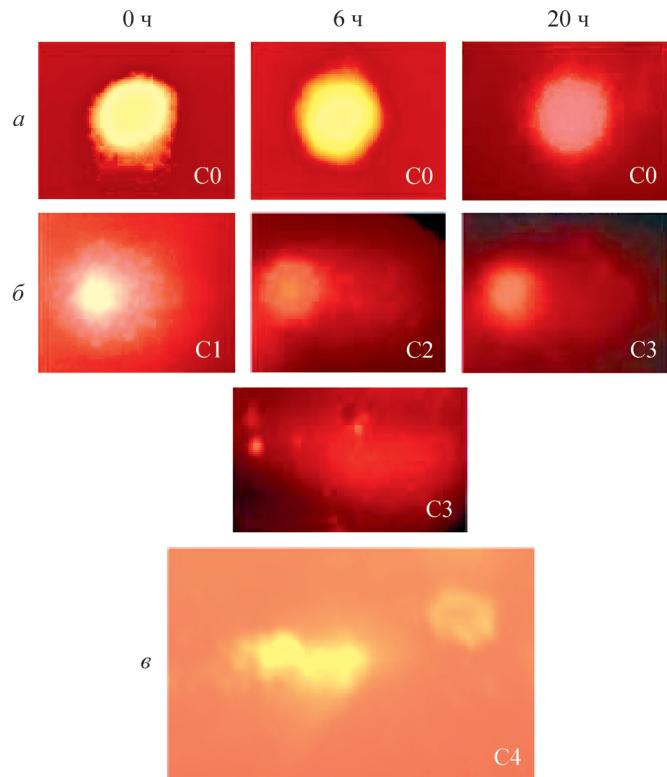


Рис. 4. Микрофотографии ДНК-комет клеток сразу после добавления 10^{-6} моль/л пероксида водорода (0 ч) и через 6 и 20 ч после этого.

a — интактные клетки; *б* — после добавления H_2O_2 ; *в* — некротические клетки через 20 ч после добавления H_2O_2 .

класса С3. По нашему мнению, по прошествии 20 ч после воздействия на лимфоциты H_2O_2 обнаруживаются кометы класса С4 (деградация генома и экскреция низкополимерной ДНК из клетки) (рис. 4).

Уровень повреждений ДНК выражается различными параметрами, вычисляемыми при анализе микроизображений нуклеоидов с помощью программного обеспечения. Это длина кометы, высота, процентное содержание ДНК в голове кометы, процентное содержание ДНК в хвосте кометы, момент хвоста и оливье-момент (Ostling, Johanson, 1984; Singh et al., 1988; Olive et al., 1990). Мы измеряли только долю ДНК в хвосте кометы ($T, \%$), характеризующую уровень повреждений в ДНК исследуемых клеток, наличие которых можно рассматривать как сигнал к инициации апоптоза (Hartmann et al., 2003). На рис. 5 показаны изменения величины T для лимфоцитов после воздействия УФ-света (*a*) и H_2O_2 (*б*).

Обнаружено повышение по отношению к контролю ($p < 0.05$) уровня повреждения ДНК лимфоцитов (величина T) сразу после УФ-облучения в дозах 1510 и 3020 Дж/ m^2 и через 6 и 20 ч после облучения в дозах 151, 1510 и 3020 Дж/ m^2 (рис. 5). Наиболее существенное возрастание степени поврежденности ДНК зарегистрировано через 6 ч после УФ-облучения лимфоцитов в дозе 1510 Дж/ m^2 . Уровень поврежденности ДНК клеток, облученных в дозе 3020 Дж/ m^2 , выше, чем у контрольных клеток, но через 6 и 20 ч после облучения он такой же, как и сразу после облучения. Повышение по сравнению с контролем ($P < 0.05$) уровня поврежденности ДНК лимфоцитов, обработанных H_2O_2 , зарегистрировано сразу и через 6 ч после воздействия (рис. 5, *б*). Наибольший объем повреждений ДНК приходится на время 6 ч после обработки лимфоцитов H_2O_2 .

Итак, через 20 ч после УФ-облучения лимфоцитов в дозе 151 Дж/ m^2 в агаровном геле обнаруживаются фрагменты ДНК клеток размерами 6000 и < 1500 п. н. Метод ДНК-комет позволил выявить кометы класса С2, характерные для предапоптотических клеток (фрагменты ≤ 50 тыс. п. н.). При дозе облучения 1510 Дж/ m^2 через 20 ч образуются фрагменты ДНК размером менее 1500 п. н. и ДНК-кометы класса С3, что указывает на межнуклеосомную фрагментацию ДНК, характерную для

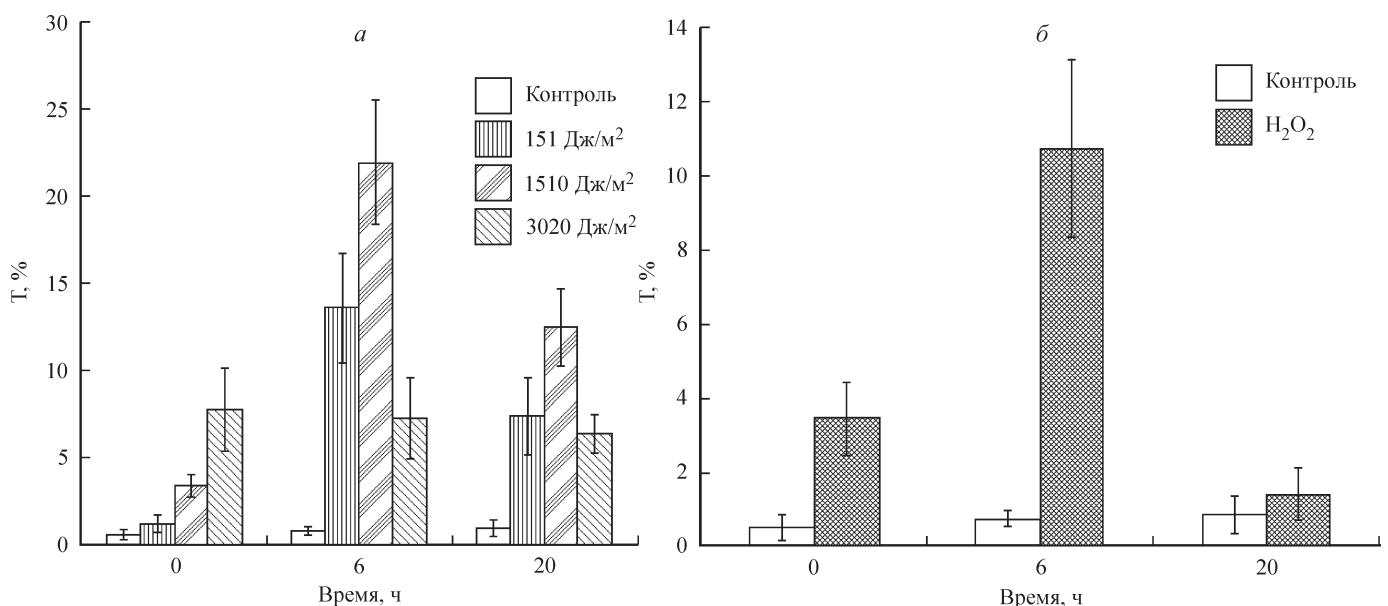


Рис. 5. Изменения содержания ДНК (T) в хвосте комет лимфоцитов после УФ-облучения в разных дозах (*а*) и действия 10^{-6} моль/л пероксида водорода (*б*).

Вертикальные отрезки — доверительные интервалы средних значений.

погибающих клеток. При дозе облучения 3020 Дж/м² через 20 ч обнаружены фрагменты ДНК размером ~5000 и >1500 п. н., кометы классов С3 и С4. В этих же условиях ранее мы наблюдали инактивацию каспазы-3 (Артиухов и др., 2009). По-видимому, эти результаты указывают на возможность реализации p53-зависимого пути апоптоза, сопровождающегося выходом из митохондрий фактора AIF и индукцией каспазонезависимого пути программированной клеточной смерти.

Обработка лимфоцитов H₂O₂ вызывает образование фрагментов размером 1500—4000 п. н. и ДНК-комет классов С3 и С4, что указывает на реализацию гибели клеток по типу апоптоза, а части — по типу некроза. В исследованных образцах наблюдали отдельные кометы, типичные для некротических клеток.

Таким образом, процессу образования комет класса С3, характеризующегося межнуклеосомной фрагментацией ($N \times 180$ п. н.) в условиях воздействия УФ-света и H₂O₂, предшествует формирование комет классов С1 и С2 с образованием соответственно высокомолекулярных фрагментов ДНК размером > 300 тыс. п. н. и фрагментов размером ≤ 50 тыс. п. н. Для части клеток после их УФ-облучения в дозе 3020 Дж/м² и воздействия H₂O₂ возможна гибель по типу некроза.

Обсуждение

Известно, что УФ-излучение индуцирует апоптоз в лимфоидных клетках (Servomaa, Rytmoma, 1990). При УФ-облучении в поглощении энергии в первую очередь принимают участие компоненты мембран лимфоцитов. УФ-свет может индуцировать демаскирование скрытых (предсуществующих) молекул CD95 на поверхность лимфоидных клеток независимо от активации Fas-лиганды (Aragane et al., 1998) вследствие интенсификации процессов пероксидного фотоокисления липидов (ПФОЛ), накопления АФК, изменения структурного состояния плазматических мембран клеток, а также синтез новых молекул Fas-рецептора. При этом происходят образование тримеров Fas-рецепторов и дальнейшее преобразование апоптозного сигнала с участием цитоплазматических факторов; кроме того, после воздействия УФ-света, АФК и синглетного кислорода в смеси лимфоцитов возможна активация Fas-L, индуцирующая апоптоз иммунных клеток (Caricchio et al., 1998). Не исключена вероятность того, что УФ-свет способен активировать мембранные cascades передачи сигнала и обеспечивать передачу сигнала на Fas-рецептор изнутри клетки. Так, УФ-излучение вызывает нарушение структуры митохондрий и выход из них апоптогенных факторов (цитохрома *c*, AIF) (Murahashi et al., 2003). Остается неясным, происходит ли нарушение митохондрий непосредственно под воздействием УФ-излучения, через непосредственное повреждение ДНК или через активацию рецепторов смерти (Kulms, Schwarz, 2000).

Образование фрагментов ДНК неодинакового размера после воздействия УФ-света и АФК может быть связано с запуском различных путей апоптоза. Так, обнаружение фрагментов ДНК после облучения лимфоцитов в дозе 3020 Дж/м² более крупных, чем при облучении другими дозами, можно объяснить переключением каспазного пути программированной клеточной смерти на каспазонезависимый путь, осуществляющийся с участием фактора AIF. На это указывают изменения уровня функциональ-

ной активности эффекторной каспазы-3 после воздействия на лимфоциты человека УФ-света в различных дозах (Артиухов и др., 2009). Возможность осуществления апоптоза по каспазонезависимому пути в присутствии ингибитора каспаз (z VAD-fmk) в условиях воздействия УФ-света средневолнового диапазона ($\lambda_{max} = 315$ нм) была показана для Т-клеток человека линии Jurkat (Murahashi et al., 2003). Следует подчеркнуть, что указанная спектральная линия присутствует в спектре излучения применяемой нами лампы типа ДРТ-400.

Известно, что УФ-свет вызывает повреждение ядерной ДНК, которое индуцирует апоптоз через активацию транскрипционного фактора p53 (Ozawa et al., 1999). Используемый нами источник УФ-излучения содержит спектральные линии 253.7 и 265.2 нм, которые могут поглощаться азотистыми основаниями нуклеиновых кислот. Методом ДНК-комет установлено, что повреждения ДНК (однонитевые разрывы) обнаруживаются сразу после УФ-облучения лимфоцитов в дозах 1510 и 3020 Дж/м² и добавления H₂O₂ в концентрации 10⁻⁶ моль/л (кометы С1) и достигают максимума спустя 6 ч после воздействия указанных агентов (кометы С2 и С3). Вероятно, накопление однонитевых разрывов ДНК приводит в итоге к формированию двухнитевых разрывов, являющихся сигналом к запуску апоптоза лимфоцитарных клеток.

Белок p53 влияет и на внешний, и на митохондриальный пути индукции апоптоза (Gottlieb, Oren, 1998; Vousden, 2000; Vousden, Lu, 2002). Влияя на митохондриальный путь, p53 препрессирует транскрипцию антиапоптозного белка Bcl2 и активирует транскрипцию проапоптозных белков Bax (Miyashita, Reed, 1995), Noxa (Oda et al., 2000a), p53AIP1 (Oda et al., 2000b) и Puma (Nakano, Vousden, 2001; Yu et al., 2001). Кроме того, p53 активирует транскрипцию гена APAF1 (Fortin et al., 2001; Moroni et al., 2001; Robles et al., 2001), повышает чувствительность клеток к внешним проапоптозным факторам, стимулируя транскрипцию генов Fas (APO1) (Owen-Schaub et al., 1995) и KILLER/DR5 (Wu et al., 1997). Белок p53 активирует также множество других белков, связанных с индукцией апоптоза. К ним относятся Perg (Attardi et al., 2000), Pidd (Lin et al., 2000), Wip1 (Fiscella et al., 1997), Scotin (Bourdon et al., 2002), GML, STAG1, p53CABC1, p53RDL1 (Nakamura, 2004) и др. Существует также значительная группа p53-индуцируемых генов, функция которых связана с изменением редокс-баланса клетки. К ним относятся гены PIG3, PIG8 (Polyak et al., 1997), FDXR (Hwang et al., 2001) и некоторые другие. Согласно одной из моделей (Polyak et al., 1997), резкое повышение уровня внутриклеточных кислородных радикалов, происходящее при индукции данной группы генов, может способствовать ускорению клеточной смерти.

Таким образом, можно предположить участие p53-зависимого пути в реализации апоптоза лимфоцитов человека в условиях воздействия УФ-света и АФК.

Список литературы

Артиухов В. Г., Наквасина М. А., Трубицына М. С., Попова Т. Н., Искусных И. Ю. 2009. Рецепторные каспазонезависимый и каспазонезависимый пути апоптоза лимфоцитов человека, индуцированного УФ-излучением. Радиационная биология. Радиоэкология. 49 (4) : 432—437.

Владимирская Е. Б. 2002. Апоптоз и его роль в регуляции клеточного равновесия (лекция). Клиническая лабораторная диагностика. 11 : 25—33.

- Дудник Л. Б., Цюпко А. Н., Хренов А. В., Алесенко А. В. 2001. Влияние билирубина на пероксидное окисление липидов, активность сфингомиелиназы и апоптоз, индуцированный сфингозином и УФ-облучением. Биохимия. 66 (9) : 1252—1262.
- Лонская И. А., Афанасьев В. Н., Печатников В. А. 1997. Индукция и подавление апоптоза в тимоцитах крысы ультрафиолетовым облучением. Биофизика. 42 (3) : 680—685.
- Меньшикова Е. Б., Зенков Н. К. 1997. Окислительный стресс при воспалении. Успехи соврем. биол. 117 (2) : 155—157.
- Миронов А. Ф. 1996. Фотодинамическая терапия рака — новый эффективный метод диагностики и лечения злокачественных опухолей. Сорос. образоват. журн. 2 (8) : 32—40.
- Плетюшкина О. Ю., Фетисова Е. К., Лямзаев К. Г., Иванова О. Ю., Домнина Л. В., Высоких М. Ю., Пустовойтко А. В., Алексеевский А. В., Алексеевский Д. А., Васильев Ю. М. 2006. Пероксид водорода, образуемый внутри митохондрий, участвует в передаче апоптозного сигнала от клетки к клетке. Биохимия. 71 (1) : 75—84.
- Рвачев В. П. 1966. Введение в биофизическую фотометрию. Львов: ЛГУ. 378 с.
- Сирота Н. П., Кузнецова Е. А. 2008. Уровень спонтанных повреждений ДНК в лейкоцитах периферической крови людей разного возраста. Бюл. эксперим. биол. и медицин. 145 (2) : 154—156.
- Скулачев В. П. 2001. Явления запрограммированной смерти. Митохондрии, клетки и органы: роль активных форм кислорода. Сорос. образоват. журн. 7 (6) : 4—10.
- Тронов В. А., Пелевина И. И. 1996. Метод ДНК-комет индивидуальных клеток. Принцип и применение метода. Цитология. 38 (4/5) : 631—641.
- Тронов В. А., Терещенко Д. Г., Коноплянников М. А. 1998. Механизм радиационной гибели лимфоцитов периферической крови человека, оцениваемый методом ДНК-комет. Биофизика. 43 (1) : 115—124.
- Чумаков В. Н., Осинская Л. Ф. 1977. Количественный метод определения активности цинк-, медью зависимой супероксиддисмутазы в биологическом материале. Вопр. мед. химии. 5 : 712—716.
- Aragane Y., Kulms D., Metze D., Wilkes G., Poppelman B., Luger T. A., Schwarz T. 1998. Ultraviolet light induces apoptosis via direct activation of CD95 (Fas/APO-1) independently of its ligand CD95L. J. Cell Biol. 140 : 171—182.
- Attardi L. D., Reczek E. E., Cosmas C., Demicco E. G., McCurrach M. E., Lowe S. W., Jacks T. 2000. PERP, an apoptosis-associated target of p53, is a novel member of the PMP-22/gas3 family. Genes Develop. 14 : 704—718.
- Bourdon J. C., Renzing J., Robertson P. L., Fernandes K. N., Lane D. P. 2002. Scotin, a novel p53-inducible proapoptotic protein located in the ER and the nuclear membrane. J. Cell Biol. 158 : 235—246.
- Caricchio R., Reap E. A., Cohen P. L. 1998. Fas/Fas ligand interactions are involved in ultraviolet-B-induced human lymphocyte apoptosis. J. Immunol. 161 : 241—251.
- Collins A. R., Ma A. G., Duthie S. J. 1995. The kinetics of repair of oxidative DNA damage (strand breaks and oxidised pyrimidine) in human cells. Mutat. Res. 336 : 69—77.
- Curnutte J. T., Babior B. M. 1974. Biological defense mechanisms. The effect of bacteria and serum on superoxide production by granulocytes. J. Clin. Invest. 53 : 1662—1672.
- Fiscella M., Zhang H., Fan S., Sakaguchi K., Shen S., Mercer W. E., Vande Woude G. F., O'Connor P. M., Appella E. 1997. Wip1, a novel human protein phosphatase that is induced in response to ionizing radiation in a p53-dependent manner. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 94 : 6048—6053.
- Fortin A., Cregan S. P., MacLaurin J. G., Kushwaha N., Hickman E. S., Thompson C. S., Hakim A., Albert P. R., Cecconi F., Heilin K., Park D. S., Slack R. S. 2001. APAF1 is a key transcriptional target for p53 in the regulation of neuronal cell death. J. Cell Biol. 155 : 207—216.
- Goldstein S., Czapski G. 1984. Mannitol as an OH[•] scavenger in aqueous solutions and in biological systems. Int. J. Radiat. Biol. 46 : 725—729.
- Gottlieb T. M., Oren M. 1998. P53 and apoptosis. Semin. Cancer Biol. 8 : 359—368.
- Hartmann A., Agurell E., Beevers C., Brendler-Schwaab S., Burlinson B., Clay P., Collins A., Smith A., Speit G., Thybaud V., Tice R. R. 2003. Recommendations for conducting the *in vivo* alkaline Comet assay. Mutagenesis. 18 : 45—51.
- 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. 2001. Ferredoxin reductase affects p53-dependent, 5-fluorouracil-induced apoptosis in colorectal cancer cells. Nat. Med. 7 : 1111—1117.
- Kulms D., Schwarz T. 2000. Molecular mechanisms of UV-induced apoptosis. Photodermatol. Photoimmunol. Photomed. 16 : 195—201.
- Lin Y., Ma W., Benchimol S. 2000. Pidd, a new death-domain-containing protein, is induced by p53 and promotes apoptosis. Nat. Genet. 26 : 122—127.
- Martin S. J., Gotter T. G. 1991. Ultraviolet B irradiation of human leukaemia HL-60 cells *in vitro* induces apoptosis. Int. J. Radiat. Biol. 59 : 1001—1016.
- Miyashita T., Reed J. C. 1995. Tumor suppressor p53 is a direct transcriptional activator of the human bax gene. Cell. 80 : 293—299.
- Moroni M. C., Hickman E. S., Lazzerini Denchi E., Caprara G., Colli E., Cecconi F., Muller H., Helin K. 2001. Apaf-1 is a transcriptional target for E2F and p53. Nat. Cell Biol. 3 : 552—558.
- Murahashi H., Azuma H., Zamzami N., Furuya K., Ikebuchi K., Yamaguchi M., Yamada Y., Sato N., Fujihara M., Kroemer G., Ikeeda H. 2003. Possible contribution of apoptosis-inducing factor (AIF) and reactive oxygen species (ROS) to UVB-induced caspase-independent cell death in the T cell line Jurkat. J. Leukocyte Biol. 73 : 399—406.
- Nakamura Y. 2004. Isolation of p53-target genes and their functional analysis. Cancer Sci. 95 : 7—11.
- Nakano K., Vousden K. H. 2001. Puma, a novel proapoptotic gene, is induced by p53. Mol. Cell. 7 : 683—694.
- Neil W. Boyce, Stephen R. Holdsworth. 1986. Hydroxyl radical mediation of immune renal injury by desferrioxamine. Kidney Int. 30 : 813—817.
- Oda E., Ohki R., Murasawa H., Nemoto J., Shibue T., Yamashita T., Tokino T., Taniguchi T., Tanaka N. 2000a. Noxa, a BH3-only member of the Bcl-2 family and candidate mediator of p53-induced apoptosis. Science. 288 : 1053—1058.
- Oda K., Arakawa H., Tanaka T., Matsuda K., Tanikawa C., Mori T., Nishimori H., Tamai K., Tokino T., Nakamura Y., Taya Y. 2000b. p53AIP1, a potential mediator of p53-dependent apoptosis, and its regulation by Ser-46-phosphorylated p53. Cell. 102 : 849—862.
- Olive P. L., Banath J. P., Durand R. E. 1990. Heterogeneity in radiation-induced DNA damage and repair in tumor and normal cells measured using the «comet» assay. Radiat. Res. 122 : 86—94.
- Ostling O., Johanson K. J. 1984. Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damage in individual mammalian cells. Biochem. Biophys. Res. Commun. 123 : 291—298.
- 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., Krzel E., Radinsky R. 1995. Wild-type human p53 and a temperature-sensitive mutant induce Fas/APO-1 expression. Mol. Cell. Biol. 15 (6) : 3032—3040.
- Ozawa B. M., Ferenczi K., Kikuchi T., Cardinale I., Austin L. M., Coven T. R., Burack L. H., Krueger J. G. 1999. 312-nanometer ultraviolet B light (narrow-band UVB) induces apoptosis of T cells within psoriatic lesions. Exp. Med. 189 : 711—718.
- Polyak K., Xia Y., Zweier J. L., Kinzler K. W., Vogelstein B. 1997. A model for p53-induced apoptosis. Nature. 389 : 300—305.
- Robles A. I., Bemmels N. A., Foraker A. B., Harris C. C. 2001. APAF-1 is a transcriptional target of p53 in DNA damage-induced apoptosis. Cancer Res. 61 : 6660—6664.

- Roos D.* 1980. The metabolic response to phagocytosis. In: The cell biology of inflammation. Amsterdam: Elsevier. 2 : 337—385.
- Servomaa K., Rytomaa T.* 1990. UV light and ionizing radiations cause programmed death of rat chlorleukemia cells by inducing retropositions of a mobile DNA element (L1Rn). *Int. J. Radiat. Biol.* 57 : 331—343.
- Singh N. P., McCoy M. T., Tice R. R., Schneider E. L.* 1988. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp. Cell Res.* 175 : 184—191.
- Steinbeck M. J., Khan A. U., Karnovsky M. J.* 1992. Intracellular singlet oxygen generation by phagocytosing neutrophils in response to particles coated with a chemical trap. *J. Biol. Chem.* 267 : 13 425—13 433.
- Vousden K. H.* 2000. p53. Death star. *Cell.* 103 : 691—694.
- Vousden K. H., Lu X.* 2002. Live or let die: the cell's response to p53. *Nat. Rev. Cancer.* 2 : 594—604.
- Wu G. S., Burns T. F., McDonald E. R., 3rd, 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.* 1997. KILLER/DR5 is a DNA damage-inducible p53-regulated death receptor gene. *Nat. Genet.* 17 : 141—143.
- Yu J., Zhang L., Hwang P. M., Kinzler K. W., Vogelstein B.* 2001. PUMA induces the rapid apoptosis of colorectal cancer cells. *Mol. Cell.* 7 : 673—682.

Поступила 30 VII 2009

FRAGMENTATION OF DNA LYMPHOCYTES THE HUMAN
IN DYNAMICS OF DEVELOPMENT APOPTOSIS, INDUCED INFLUENCE OF UV-RADIATION
AND REACTIVE OXYGEN SPECIES

V. G. Artyukhov,¹ M. S. Trubicina, M. A. Nakvasina, E. V. Solovjeva

Voronezh State University;
¹ e-mail: avg@main.vsu.ru

It is established that UV-light (240—390 nm) in doses of 151, 1510 and 3020 J/m² and reactive oxygen species and singlet oxygen induce DNA fragmentation lymphocytes cells of the human 20 h after influence. Using a method of DNA-comets it is revealed that DNA damages (single strand breaks) are found out right after UV-irradiations of lymphocytes in doses of 1510 and 3020 J/m² and additions hydrogen peroxide in concentration of 10⁻⁶ mol/l (a comet of type C1) and reach a maximum through 6 h after influence on of cells UV-light and ROS (comets of types C2 and C3). Assumption about the leading part of a p53-dependent way in realization apoptosis human lymphocytes in the conditions of influence of UV-light and reactive oxygen species is put forward.

Key words: lymphocytes, DNA-comets, apoptosis, UV-light, reactive oxygen species.