

АПОПТОЗ И НЕКРОЗ ЛИМФОЦИТОВ, ИНДУЦИРОВАННЫЕ УЛЬТРАФИОЛЕТОВЫМ ОБЛУЧЕНИЕМ В ПРИСУТСТВИИ АУТОЛОГИЧНОЙ ПЛАЗМЫ

© В. Г. Артюхов,¹ О. В. Земченкова,² О. В. Башарина,¹ С. В. Рязанцев,² М. В. Пашков²

¹ Кафедра биофизики и биотехнологии Воронежского государственного университета
и ² Воронежская медицинская академия им. Н. Н. Бурденко;

² электронный адрес: zov-bio@mail.ru

Исследовано влияние ультрафиолетового (УФ) света (240—390 нм) в дозе 151—3020 Дж/м² на характер гибели лимфоцитарных клеток крови доноров (с использованием маркеров апоптотической и некротической гибели клеток) и на уровень маркера апоптотической готовности — рецептора CD95. Показано, что УФ-излучение повышает экспрессию CD95-рецепторов, что обусловлено в основном синтезом *de novo*. Выявлено, что в ходе 1-суточной инкубации фотомодифицированных лимфоцитов (при дозах облучения 151 и 755 Дж/м²) без аутологичной плазмы крови происходит гибель клеток путем рецепторопосредованного апоптоза. Воздействие высоких доз облучения (1510 и 3020 Дж/м²) приводит к массовой некротической гибели иммунцитов. Использование аутологичной плазмы крови при инкубации фотомодифицированных лимфоцитов позволяет снизить количество и апоптотических, и некротических клеток.

Ключевые слова: апоптоз, лимфоциты, некроз, УФ-свет, CD95.

Принятые сокращения: АФК — активные формы кислорода, ПОЛ — перекисное окисление липидов, СОД — супероксиддисмутаза, УФ — ультрафиолетовый, PI — иодистый пропилий, PC5 — комплекс фикоэритрина с цианином 5.

Изучение и анализ механизмов трансформации энергии ультрафиолетового (УФ) излучения, поглощенной живыми системами различных уровней организации, связаны в первую очередь с тем, что УФ-свет выступает в качестве тонкого регуляторного агента; это позволяет исследовать биофизические основы взаимосвязей сетей, обеспечивающих поддержание различных типов гомеостатических процессов в живых системах. В организме здорового человека клеточный гомеостаз определяется балансом между гибелью и пролиферацией клеток.

Апоптоз представляет собой процесс физиологической гибели клеток, при котором происходят изменения во всех структурах клетки: в ядре (межнуклеосомная фрагментация ДНК, конденсация хроматина, кариорексис с последующим образованием апоптотических телец), в цитоплазме (расширение эндоплазматического ретикулума, конденсация и уменьшение гранул, снижение трансмембранного потенциала митохондрий и др.), в плазматической мембране (повышение проницаемости для небольших молекул, утрата ворсинчатости и образование пузыревидных вздутий, появление на поверхности фосфатидилсерина, не обнаруживаемого в норме, и др.) (Самуилов и др., 2000; Ярилин, 2001; Kountouras et al., 2003). Апоптоз важен для уравнивания процессов пролиферации, дифференцировки, а также элиминации функционально неполноценных иммунокомпетентных клеток (Никонова и др., 1999; Хаитов, 2001; Ярилин, 2001; Барышников, Шишкин, 2002; Потапнев, 2002).

Показано, что различные заболевания сопровождаются, с одной стороны, нарушением программы апоптоза, с другой — дисбалансом окислительного метаболизма (Зенков и др., 2001). При этом избыточная генерация активных форм кислорода (АФК) в тканях и клетках на фоне истощения резервов антиоксидантной защиты оказывает влияние на функциональное состояние редокс-чувствительных систем внутриклеточной регуляции апоптоза. К числу последних относятся митогенактивируемые протеинкиназы JNK и p38, активирующие ответственные за реализацию летальной программы клеток белки-мишени, среди которых факторы транскрипции NF-κB и p53 (Gallo, Johnson, 2002).

К настоящему времени установлено, что УФ-свет является потенциальным индуктором апоптоза в клетках различных типов, в том числе и иммунокомпетентных (Servomaa, Rytomaa, 1990; Martin, Cotter, 1991; Лонская и др., 1997; Меньщикова, Зенков, 1997; Плетюшкина и др., 2006). Выявлено, что в реализации апоптоза лимфоцитов, облученных УФ в дозах 151 и 1510 Дж/м², принимают участие рецепторопосредованный (Fas-зависимый) и p53-зависимый пути (Артюхов и др., 2011б). Инициация апоптоза в условиях действия УФ-света обусловлена рядом процессов, индуцируемых фотохимическими превращениями биомембран и ДНК клеток. При этом происходит образование олигомеров Fas-рецепторов и дальнейшее преобразование апоптотического сигнала с участием цитоплазматических факторов. Кроме того, после воздей-

ствия УФ-света в суспензии лимфоцитов возможна активация Fas-L, индуцирующая апоптоз иммунных клеток (Caricchio et al., 1998). Выявленные повреждения ДНК и рост концентрации p53 в фотомодифицированных лимфоцитах по сравнению с интактными (Артюхов и др., 2011б) свидетельствуют о запуске p53-зависимого пути апоптоза.

Механизмы регуляции апоптоза и воспаления, их маркеры при воздействии УФ-излучения до сих пор остаются недостаточно изученными, несмотря на большое количество экспериментальных данных. Между тем более глубокое понимание роли УФ-света в регуляции апоптоза и воспаления могло бы способствовать углублению знаний о патогенезе различных заболеваний, а также созданию принципиально новых направлений терапии. Для полного решения этого вопроса необходимо детальное исследование УФ-индуцированных превращений компонентов крови по отдельности и во взаимосвязи, что позволит в дальнейшем осуществлять направленную иммунорекоррекцию при различных патологиях.

В настоящей работе исследованы пути гибели фотомодифицированных лимфоцитарных клеток, инкубированных в отсутствие и в присутствии аутологичной плазмы крови.

Материал и методика

Выделение лимфоцитов из периферической крови доноров осуществляли путем ее центрифугирования в градиенте плотности фиколл-урографина (1.077 г/см^3). УФ-облучение исследуемых клеток (1 мл , $1 \cdot 10^6 \text{ кл./мл}$) проводили при их непрерывном перемешивании магнитной мешалкой в термостатируемой кювете ($20 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$) полусферической формы с помощью ртутно-кварцевой лампы ДРТ-400 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). Расстояние от оси лампы до кюветы с суспензией клеток составляло 23 см, интенсивность излучения лампы — $151 \text{ Дж/(м}^2 \cdot \text{мин)}$. Использовали дозы 151, 755, 1510 и 3020 Дж/м². Плотность энергии излучения, создаваемую УФ-лучами, измеряли с помощью уфиметра, смонтированного на кафедре биофизики Воронежского государственного университета. В качестве теплового приемника УФ-излучения в уфиметре применяли термобатарейку, собранную из 50 нихромово-константановых термопар.

Нативные и облученные лимфоциты инкубировали в питательной среде RPMI-1640 в отсутствие и в присутствии 18 % аутологичной плазмы крови, циклогексимида (10^{-4} моль/л), каталазы (10^{-6} моль/л) и супероксиддисмутазы ($2 \cdot 10^{-7} \text{ моль/л}$) при $37 \text{ }^\circ\text{C}$ в атмосфере 5%-ного CO_2 в течение 24 ч.

Для корректного исключения из зоны анализа всех частиц, которые не соответствуют по размерам и гранулярности живым лимфоцитам, вводили необходимые логические ограничения в гистограммы распределения частиц по малоугловому, боковому светорассеиванию и CD45-PC5. CD45 — антиген, представленный на поверхности всех лимфоцитов человека. Использование маркера CD45 позволяет четко отделить популяцию лимфоцитов от дедбриса.

Определение уровня экспрессии CD95 и количества клеток с изучаемым маркером на поверхности мембран нативных и фотомодифицированных лимфоцитов осуще-

ствляли методом проточной цитофлуориметрии (цитофлуориметр CyFlow space, Partec). Окрашивание клеток проводили с использованием моноклональных антител: CD95-FITC и соответствующие изотипические контроли. В каждой пробе анализировали не менее 10^4 клеток.

Двойное окрашивание клеток посредством меченого 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. После отмывки в фосфатном буфере клетки ресуспендировали в 100 мкл связывающего буфера (10 ммоль/л HEPES/NaOH, pH 7.4, 140 ммоль/л NaCl и 2.5 ммоль/л CaCl₂), добавляли 5 мкл комплекса аннексин V—FITC и 2.5 мкл PI и инкубировали в темноте при комнатной температуре в течение 15 мин. Затем добавляли 400 мкл связывающего буфера и проводили измерение на проточном цитофлуориметре. В каждом образце анализировали не менее 10^4 клеток.

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

В работе использовали следующие реактивы: фиколл 400 (Dia-m, Швейцария), урографин 76 % (Schering AG, Испания), каталаза, супероксиддисмутаз (Sigma, США), циклогексимид (AppliChem, Германия), CD95—FITC, CD45—PC5 и Annexin V—FITC Kit System (Beckman Coulter, США).

Результаты и обсуждение

Показано, что через 1 ч после УФ-облучения лимфоцитов в дозах 151 и 755 Дж/м² происходит увеличение уровня содержания рецепторов CD95 на 15 и 24 % соответственно (рис. 1, а, столбцы 1). Полученные результаты указывают на то, что в условиях облучения происходит нарушение структурного состояния мембран лимфоцитов, следствием которого является экспонирование «замаскированных» маркерных молекул на клеточную поверхность. Действительно, непосредственно после УФ-облучения суспензии лимфоцитов происходит повышение уровня ПОЛ (Артюхов и др., 2011а), что связывают как с непосредственным действием УФ-света на ненасыщенные жирные кислоты, так и с фотоиндуцированным образованием АФК.

В ходе 1-суточной инкубации в отсутствие аутологичной плазмы в фотомодифицированных лимфоцитах уровень экспрессии CD95 увеличился на 42 и 59 % соответственно дозам облучения (рис. 1, а, столбцы 2), при этом степень повышения ПОЛ также имела дозозависимый характер (Артюхов и др., 2011а).

При добавлении в исследуемую систему ингибитора белкового синтеза — циклогексимида — уровень CD95 оказывался значительно ниже, чем у клеток, облученных в отсутствие этого агента, но выше контроля (рис. 1, а, столбцы 3). Следовательно, увеличение уровня CD95 в условиях инкубации фотомодифицированных лимфоцитов осуществляется не только вследствие экспонирования на поверхность плазматических мембран ранее недоступных маркеров, но и синтеза их новых молекул. Возможно, тот факт, что стимуляция синтеза белка более

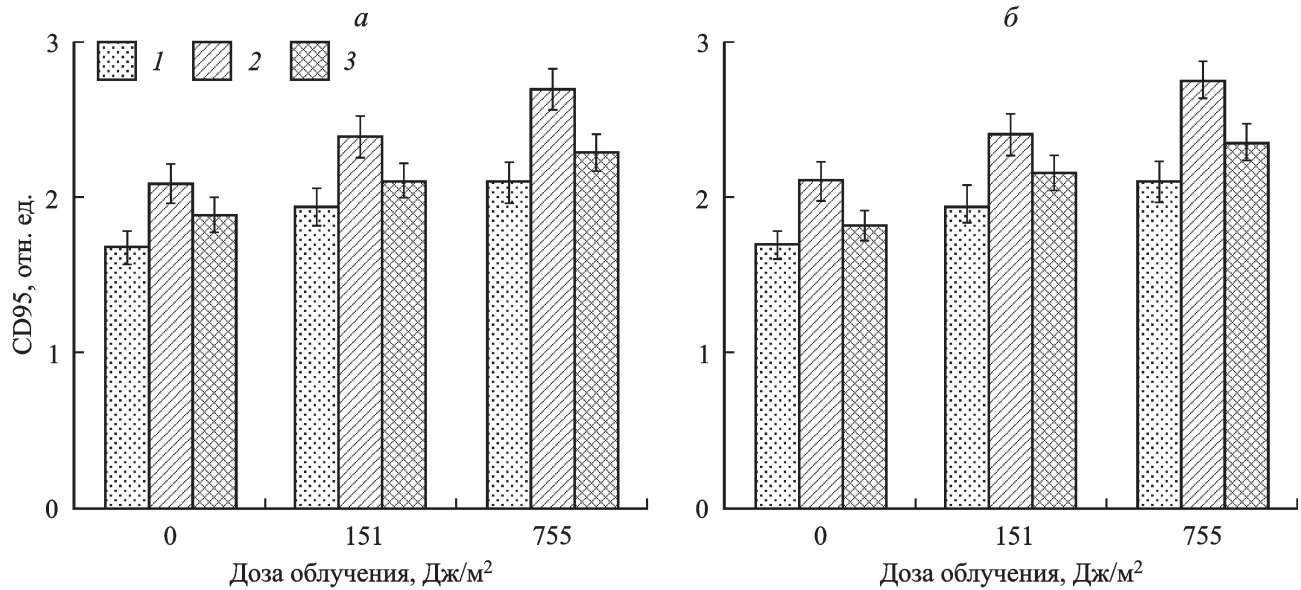


Рис. 1. Изменение уровня CD95 у лимфоцитов в ходе их инкубации через 1 ч после облучения (столбцы 1) и после 24-часовой инкубации в отсутствие (столбцы 2) и в присутствии (столбцы 3) циклогексимида (а) или плазмы крови (б).

Об уровне CD95 судили по интенсивности флуоресценции лимфоцитов, связавших FITC-меченные антитела против CD95.

выражена в УФ-облученных клетках, объясняется образованием АФК, поскольку известно, что влияние различных стимуляторов на синтез белков (индуцибельной NO-синтазы, некоторых цитокинов) в макрофагах и других клетках обусловлено внутриклеточным образованием АФК, вызывающих переход транскрипционных факторов в активное состояние.

Однако и в необлученных клетках в ходе 1-суточной инкубации без плазмы выявлено повышение уровня CD95 на мембране (на 24 % относительно нативных клеток через 1 ч после их выделения), связанное с активацией синтеза этих рецепторов. Известно, что гибель клетки путем апоптоза (а повышение экспрессии рецепторов смерти CD95 на мембране указывает на возможность запуска рецепторопосредованного пути апоптоза) может быть обусловлена не только негативной сигнализацией, но и отсутствием позитивных сигналов извне. Показано, что культивирование лимфоцитов в бессывороточной питательной среде, лишенной ростовых факторов, инициировало гибель половины количества клеток здоровых доноров путем апоптоза (Жукова и др., 2007). Важную роль в межклеточной сигнализации играют полипептидные факторы роста, дефицит которых воспринимается клеткой как сигнал к апоптозу: происходят дефосфорилирование проапоптотического белка Bad, внедрение его в наружную мембрану митохондрий, высвобождение цитохрома c и последующая активация каспазы-9 (Takamatsu et al., 2001).

При добавлении аутологичной плазмы в ходе инкубации нативных и фотомодифицированных лимфоцитов наблюдается снижение уровня рецепторов CD95 (рис. 1, б, столбцы 3). Так, в случае инкубации необлученных образцов данный параметр уменьшается до значения, характерного для свежевыведенных клеток. В фотомодифицированных лимфоцитах уровень CD95 снижается на 11 и 15 % (соответственно дозам облучения) относительно лимфоцитов, инкубируемых в отсутствие плазмы крови.

Использование ферментов антиоксидантной защиты (СОД и каталазы) как при фотомодификации, так и в ходе

инкубации УФ-облученных образцов приводит к снижению уровня рецептора CD95 по сравнению с лимфоцитами, облученными или инкубируемыми в отсутствие этих ферментов (рис. 2, столбцы 3—6).

При использовании СОД в ходе УФ-модификации лимфоцитов уровень CD95 не отличается от значения, характерного для лимфоцитов непосредственно после их

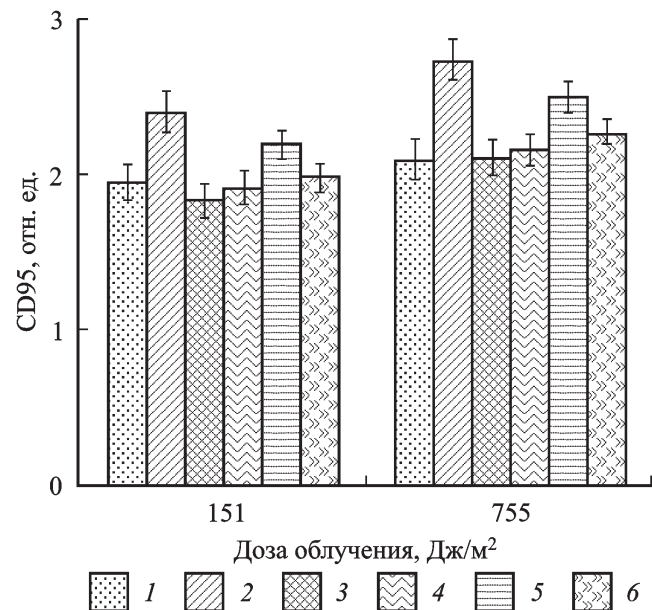


Рис. 2. Изменение уровня CD95 у лимфоцитов в течение 1-суточной инкубации их в присутствии ферментов антиоксидантной защиты.

Столбцы: 1 — клетки через 1 ч после облучения; 2 — фотомодифицированные клетки после суточной инкубации; 3, 4 — клетки, инкубированные в присутствии СОД, добавленной до и после облучения соответственно; 5, 6 — клетки, инкубированные в присутствии каталазы, добавленной до и после облучения соответственно. Об уровне CD95 судили по интенсивности флуоресценции лимфоцитов, связавших FITC-меченные антитела против CD95.

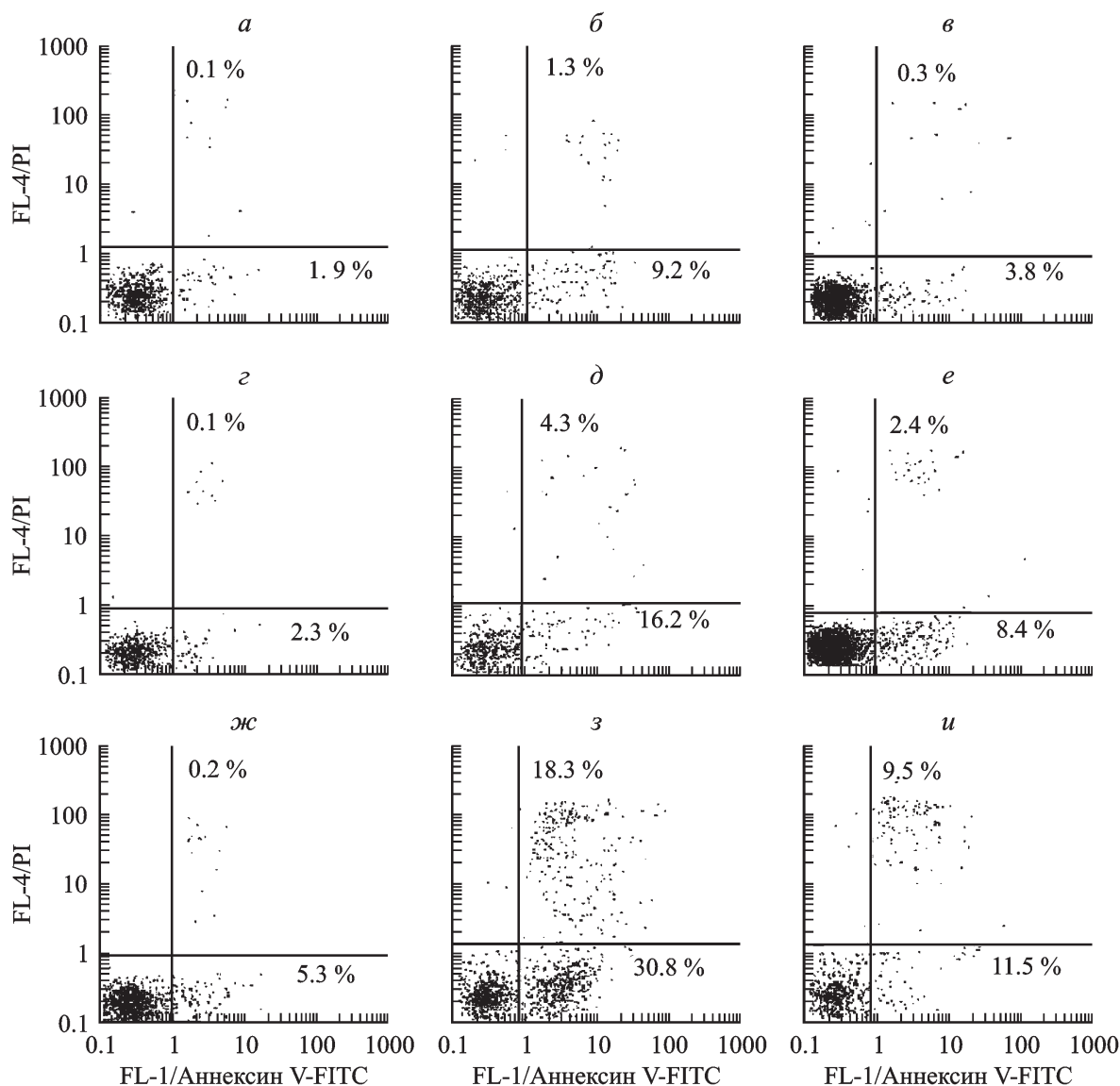


Рис. 3. Двухпараметрические цитограммы распределения лимфоцитов по их жизнеспособности.

а, г, ж — нативные и фотомодифицированные (дозы облучения 151 и 755 Дж/м²) клетки через 1 ч инкубации; *б, в* — нативные клетки, инкубированные 24 ч в отсутствие и в присутствии плазмы соответственно; *д, е* — фотомодифицированные (доза облучения 151 Дж/м²) клетки после 1-суточной инкубации в отсутствие и в присутствии плазмы крови соответственно; *з, и* — фотомодифицированные (доза облучения 755 Дж/м²) клетки после 1-суточной инкубации в отсутствие и в присутствии плазмы крови соответственно. Цифрами показаны доли (%) жизнеспособных клеток (левый нижний квадрант), апоптотических (правый нижний квадрант) и некротических клеток (правый верхний квадрант). FL-1 и FL-2 — каналы флуоресценции; PI — йодистый пропидий.

облучения (рис. 2, столбцы 3, 4), что указывает на ведущую роль супероксид-анион-радикала в активации апоптоза.

Применение каталазы при фотомодификации и инкубации лимфоцитов также приводит к снижению уровня указанного маркера, причем он снижается в большей степени при добавлении каталазы после облучения лимфоцитов, чем при совместном облучении, что подтверждает факт частичной фотоинактивации каталазы при УФ-модификации. Таким образом, вклад пероксида водорода в индукцию апоптоза менее значителен, чем супероксид-анион-радикала.

Являясь трансмембранной белковой молекулой, CD95-рецептор может активно отвечать на воздействие УФ-света и претерпевать конформационные перестройки, вызывающие его олигомеризацию в мембране. Кроме

того, к фотоиндуцируемым изменениям рецептора могут приводить интенсификация процессов ПОЛ и накопление АФК, которые в свою очередь активируют биосинтез этого белка *de novo*.

Известно, что PI является маркером клеток, находящихся в стадии позднего апоптоза или некроза (при некрозе происходит нарушение целостности клеточной мембраны, что позволяет PI войти в клетку и связаться с ДНК).

Существуют также флуоресцентные красители, способные пометить клетки, «решившие» идти по пути апоптоза. Наиболее ранним событием, предвещающим такое решение, является окисление липидов клеточных мембран, происходящее под влиянием избыточной продукции АФК. При этом особенно уязвимы ненасыщенные жирнокислотные хвосты кислых фосфолипидов, представ-

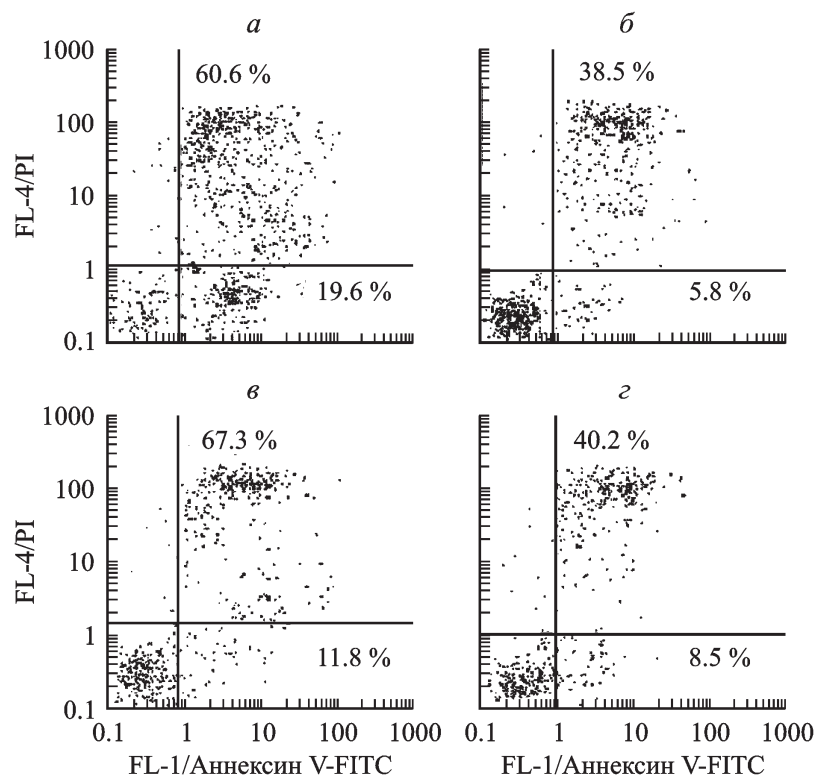


Рис. 4. Распределение лимфоцитов по их жизнеспособности в течение 1-суточной инкубации после УФ-облучения в дозах 1510 и 3020 Дж/м².

а, б — доза облучения 1510 Дж/м², инкубация в отсутствие и в присутствии плазмы соответственно; *в, г* — доза облучения 3020 Дж/м², инкубация в отсутствие и в присутствии плазмы соответственно. Остальные объяснения те же, что и к рис. 3.

ленные в мембранах в основном фосфатидилсерин. Образование гидропероксидов фосфатидилсерина нарушает его взаимодействие с белками цитоскелета — аннексинами — и облегчает миграцию окисленного фосфатидилсерина с внутренней стороны мембранного бислоя на наружную. По этой причине фосфатидилсерин, который в нормальной клетке практически полностью локализован с внутренней стороны бислоя, при индукции апоптоза начинает появляться и с внешней стороны мембраны (Fadok et al., 1998, 2000).

Поскольку транслокация фосфатидилсерина наблюдается на ранней стадии апоптоза, мечение клеток с помощью комплекса аннексин V—FITC позволяет выявить более раннюю стадию апоптоза, чем с помощью методик, основанных на повреждении ядра (ДНК-фрагментации).

Через 1 ч после УФ-облучения суспензии лимфоцитов в дозах 151 и 755 Дж/м² количество апоптотических клеток (на ранней стадии апоптоза) составляет 2.3 и 5.3 % (рис. 3, *г, ж*, *правый нижний квадрант*). Это может быть связано с нарушением фосфолипидного бислоя мембран в результате активации процессов ПОЛ, вследствие чего происходит транслокация фосфатидилсерина в наружный слой мембраны.

В ходе 1-суточной инкубации нативных лимфоцитов, инкубированных в отсутствие аутологичной плазмы крови, доля апоптотических клеток увеличивается с 1.9 до 9.2 % (рис. 3, *а, б*, *правый нижний квадрант*), что связано с отсутствием в среде инкубирования антиоксидантов и факторов роста: это является сигналом к активации программы апоптоза.

При фотомодификации клеток в дозах 151 и 755 Дж/м² количество лимфоцитов, находящихся на ран-

ней стадии апоптоза, возрастает до 16.2 и 30.8 %, а число некротических клеток составляет 4.3 и 18.3 % соответственно (рис. 3, *д, з*, *правый верхний квадрант*). При использовании высоких доз облучения (1510 и 3020 Дж/м²) наблюдается массовый характер гибели клеток путем некроза (рис. 4, *а, в*).

Зарегистрированный некроз может быть первичным или вторичным, т. е. наступившим после запуска апоптоза (Darzynkiewicz et al., 1998), однако различить эти два типа некроза в рамках настоящей работы не представляется возможным.

Использование аутологичной плазмы крови в ходе инкубации как нативных, так и фотомодифицированных клеток позволяет снизить количество и апоптотических, и некротических клеток (рис. 3, *в, е, и; 4, б, г*). Это может быть связано с тем, что в плазме крови содержатся ростовые факторы. Образующиеся в результате УФ-облучения АФК могут изменять микроокружение клеток и таким образом вовлекать в реакцию на световой стимул целые сообщества клеток и биомолекул (Sauer et al., 2001; Reth, 2002). Так, цитокины и ростовые факторы находятся в комплексе с транспортирующим их белком — плазменным альфа2-макроглобулином (Borth, 1992; Gettins, Crews, 1993). Большинство обладающих ростостимулирующими свойствами молекул (EGF, NGF, PDGF, bFGF, ИЛ-1, ИЛ-2, ИЛ-6 и TNF- α) связано с альфа2-макроглобулином непрямо, и при действии некоторых факторов, в частности оксидантов, комплекс диссоциирует, освобождая ростовые факторы и связывая противовоспалительные цитокины (Chu, Pizzo, 1994; Wu et al., 1998). В результате аутологичная плазма может снижать в лимфоцитах человека количество повреждений ДНК, вызы-

ваемых УФ-облучением (Зубанова и др., 2002). С другой стороны, плазма крови, обладая мощной антиоксидантной способностью, снижает уровень ПОЛ и соответственно окислительный стресс, тем самым предотвращая гибель клеток, т. е. может выступать в роли фактора, с помощью которого можно определять и, следовательно, регулировать или прогнозировать соотношение количества апоптотических и некротических лимфатических клеток крови.

Список литературы

- Артюхов В. Г., Земченкова О. В., Башарина О. В., Ким Я. В. 2011а. Особенности метаболизма УФ-облученных лимфоцитов. Радиационная биология. Радиоэкология. 51 (2) : 252—257. (Artyukhov V. G., Zemchenkova O. V., Basharina O. V., Kim Y. V. 2011. Peculiarities of metabolism of UV-irradiated lymphocytes. Radiat. Biol. Radioecol. 51 (2) : 252—257.)
- Артюхов В. Г., Трубицына М. С., Наквасина М. А., Соловьева Е. В., Лидохова О. В. 2011б. Пути реализации апоптоза лимфоцитов человека, индуцированного УФ-светом и активными формами кислорода. Радиационная биология. Радиоэкология. 51 (4) : 425—443. (Artyukhov V. G., Trubitsyna M. S., Nakvasina M. A., Soloveva E. V., Lidohova O. V. 2011. Ways of realizing apoptosis of human lymphocytes induced by UV-light and reactive oxygen species. Radiat. Biol. Radioecol. 51 (4) : 425—443.)
- Барышников А. Ю., Шишкин А. В. 2002. Иммунологические проблемы апоптоза. М.: Эриториал УРПС. 320 с. (Baryshnikov A. Yu., Shishkin Yu. V. 2002. Immunological problems apoptosis. Moscow: Eritorial URSS. 320 p.)
- Жукова О. Б., Рязанцева Н. В., Новицкий В. В., Радзивил Т. Т., Литвинова Л. С., Часовских Н. Ю. 2007. Модуляция программируемой гибели лимфоцитов периферической крови при хронической вирусной инфекции. Цитология. 49 (1) : 26—31. (Zhukova O. B., Ryazantseva N. V., Novitskiy V. V., Radzivil T. T., Litvinova L. S., Chasovskikh N. Yu. 2007. Modulation of programmed death of the peripheral blood lymphocytes under chronic virus infection. Tsitologiya. 49 (1) : 26—31.)
- Зенков Н. К., Ланкин В. З., Меньщикова Е. Б. 2001. Окислительный стресс: биохимические и патофизиологические аспекты. М.: МАИК, Наука, Интерпериодика. 343 с. (Zenkov N. K., Lankin V. Z., Menshchikova E. B. 2001. Oxidative stress: biochemical and pathophysiological aspects. Moscow: Int. Acad. Publ. Comp., Science, Interperiodica. 343 p.)
- Зубанова О. И., Снопов С. А., Михельсон В. М., Самойлова К. А. 2002. Стимуляция репарации ДНК растворимыми факторами фотомодифицированной крови в клетках человека, поврежденных УФ- и ионизирующей радиацией. Цитология. 44 (5) : 463—469. (Zubanova O. I., Snopov S. A., Mikhelson V. M., Samoilova K. A. 2002. Stimulation of DNA repair in human cells damaged by UV and ionizing radiation with soluble growth factors of photomodified blood. Tsitologiya. 44 (5) : 463—469.)
- Лонская И. А., Афанасьев В. Н., Печатников В. А. 1997. Индукция и подавление апоптоза в тимocyтах крысы ультрафиолетовым облучением. Биофизика. 42 (3) : 680—685. (Lonskaya I. A., Afanasyev V. N., Pechatnikov V. A. 1997. Induction and suppression of apoptosis in rat thymocytes by ultraviolet irradiation. Biophysics. 42 (3) : 680—685.)
- Меньщикова Е. Б., Зенков Н. К. 1997. Окислительный стресс при воспалении. Успехи соврем. биол. 117 (2) : 155—157. (Menshchikova E. B., Zenkov N. K. 1997. Oxidative stress in inflammation. Biology Bulletin Reviews. 117 (2) : 155—157.)
- Никонова М. Ф., Литвина М. М., Варфоломеева М. И., Ярилина А. А., Ярилин А. А. 1999. Апоптоз и пролиферация как альтернативные формы ответа Т-лимфоцитов на стимуляцию. Иммунология. 2 : 20—23. (Nikonova M. F., Litvina M. M., Varfolomeeva M. I., Yarinina A. A., Yarilin A. A. 1999. Apoptosis and proliferation as alternative forms of T-lymphocytes response to stimulation. Immunology. 2 : 20—23.)
- Плетюшкина О. Ю., Фетисова Е. К., Лямзаев К. Г., Иванова О. Ю., Домнина Л. В., Высоких М. Ю., Пустовидко А. В., Алексеевский А. В., Алексеевский Д. А., Васильев Ю. М. 2006. Пероксид водорода, образуемый внутри митохондрий, участвует в передаче апоптотического сигнала от клетки к клетке. Биохимия. 71 (1) : 75—84. (Pletyushkina O. Yu., Fetisova E. K., Lyamsaev K. G., Ivanova O. Yu., Domnina L. V., Vysokikh M. Yu., Pustovidko A. V., Alexceevski A. V., Alexceevski D. A., Vasilev J. M. 2006. Hydrogen peroxide produced inside mitochondria takes part in cell-to-cell transmission of apoptotic signal. Biochemistry (Moscow). 71 (1) : 75—84.)
- Потаннев М. П. 2002. Апоптоз клеток иммунной системы и его регуляция цитокинами. Иммунология. 4 : 237—243. (Potannev M. P. 2002. Apoptosis in the immune system cells and its regulation by cytokines. Immunology. 4 : 237—243.)
- Самуилов В. Д., Алексин А. В., Лагунова Е. М. 2000. Программируемая клеточная гибель. Биохимия. 65 (8) : 1029—1046. (Samuilov V. D., Oleskin A. V., Lagunova E. M. 2000. Programmed cell death (review). Biochemistry (Moscow). 65 (8) : 1029—1046.)
- Хаитов Р. М. 2001. Физиология иммунной системы. М.: ВИНТИ РАН. 224 с. (Khaitov R. M. 2001. Immune system physiology. Moscow: All-Russian Inst. of Sci. and Tech. Inform. Russian Academy of Sciences. 224 p.)
- Ярилин А. А. 2001. Апоптоз: природа феномена и его роль в норме и при патологии. В кн.: Актуальные проблемы патофизиологии. М.: Медицина. 13—56. (Yarilin A. A. 2001. Apoptosis: the nature of the phenomenon and its role in health and disease. In: Frost B. B. (Ed.) Actual problems of pathophysiology. Moscow: Medicine. 13—56.)
- Borth W. 1992. Alpha-2-macroglobulin, a multifunctional binding protein. FASEB J. 6 : 3345—3353.
- 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.
- Chu C. T., Pizzo S. V. 1994. α 2-macroglobulin, complement and biologic defense: antigens, growth factors, microbial proteases, and receptor legation. Lab. Invest. 71 : 792—812.
- Darzynkiewicz Z., Bedner E., Traganos F., Murakami T. 1998. Critical aspects in the analysis of apoptosis and necrosis. Hum. Cell. 11 : 3—12.
- Fadok V. A., Bratton D. L., Frasch S. C., Warner M. L., Henson P. M. 1998. The role of phosphatidylserine in recognition of apoptotic cells by phagocytes. Cell Death Differ. 5 : 551—562.
- Fadok V. A., Bratton D. L., Rose D. M., Pearson A., Ezekowitz R. A., Henson P. M. 2000. A receptor for phosphatidylserine-specific clearance of apoptotic cells. Nature. 405 : 85—90.
- Gallo K. A., Johnson G. L. 2002. Mixed-lineage kinase control of JNK and p38 MAPK pathways. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 3 : 663—672.
- Gettins P. G., Crews B. C. 1993. Epidermal growth factor binding to human α 2-macroglobulin. Implications for α 2-macroglobulin-growth factor interactions. Biochemistry. 32 : 7916—7921.
- Kountouras J., Zavos C., Chatzopoulos D. 2003. Apoptosis in Hepatitis C. J. Viral. Hepat. 10 : 335—342.
- Martin S. J., Cotter T. G. 1991. Ultraviolet B irradiation of human leukemia HL-60 cells *in vitro* induces apoptosis. Intr. J. Radiat. Biol. 59 : 1001—1016.
- Reth M. 2002. Hydrogen peroxide as second messenger in lymphocyte activation. Nature Immunol. 3 : 1129—1134.
- Sauer H., Wartenberg M., Hescheler J. 2001. Reactive oxygen species as intracellular messengers during cell growth and differentiation. Cell. Physiol. Biochem. 11 : 173—186.
- 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.
- Takamatsu M., Fujita T., Hotta H. 2001. Suppression of serum starvation-induced apoptosis by hepatitis C virus core protein. Kobe J. Med. Sci. 47 : 97—112.

Wu S. M., Patel D. D., Pizzo S. V. 1998. Oxidized α 2-macroglobulin (α 2M) differentially regulates receptor binding by cytokines/growth factors: implications for tissue injury and repair mechanisms in inflammation. *J. Immunol.* 161 : 4356—4365.

Поступила 27 V 2013

APOPTOSIS AND NECROSIS OF LYMPHOCYTES INDUCED BY UV-RADIATION
IN THE PRESENCE OF AUTOLOGICAL PLASMA

V. G. Artyukhov,¹ O. V. Zemchenkova,² O. V. Basharina,¹ S. V. Ryazantsev,² M. V. Pashkov²

¹ Department of Biophysics and Biotechnology Voronezh State University and

² N. N. Burdenko Medical Academy, Voronezh;

² e-mail: zov-bio@mail.ru

The influence of UV-light (240—390 nm) in doses 151—3020 J/m² on the nature of the death of lymphocytes cells of donor's blood (using markers of apoptotic and necrotic death of cells) and on the level of expression of the marker of apoptotic pre-preparation — CD95-receptor has been investigated. We have shown that UV-radiation increases expression of CD95-receptors which is caused mainly by *de novo* synthesis of the receptors. It has been revealed that during daily incubation of photo-modified lymphocytes (151 and 755 J/m²) without autological blood cell death occurs by receptor-involved apoptosis. Exposure to high doses of radiation (1510 and 3020 J/m²) causes massive necrotic death of immunocytes. The use of autologous blood plasma during incubation of photo-modified lymphocytes allows decreasing the number of both apoptotic and necrotic cells.

Key words: apoptosis, CD95, lymphocytes, necrosis, UV-radiation.