

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
ВЫСШЕГО ПРОФЕССИОНАЛЬНОГО ОБРАЗОВАНИЯ
«ВОРОНЕЖСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»

На правах рукописи

ТЮНИНА ОЛЬГА ИВАНОВНА

ИССЛЕДОВАНИЕ МЕХАНИЗМОВ ДЕЙСТВИЯ МОНООКСИДА УГЛЕРОДА И
УФ-СВЕТА НА СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНОЕ СОСТОЯНИЕ
ЛИМФОЦИТОВ И ЭРИТРОЦИТОВ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА

03.01.02. Биофизика

ДИССЕРТАЦИЯ

На соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель:
доктор биологических наук,
профессор Артюхов В.Г.

Воронеж

2015

ОГЛАВЛЕНИЕ

ПЕРЕЧЕНЬ СОКРАЩЕНИЙ, УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ, СИМВОЛОВ И ТЕРМИНОВ	8
ВВЕДЕНИЕ	10
Глава 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	
1.1. Структурно-функциональная характеристика клеток крови человека	16
1.1.1. Характеристика лимфоцитов крови человека, особенности их строения и метаболизма	16
1.1.2. Характеристика эритроцитов крови человека, особенности их строения и метаболизма	23
1.2. Апоптоз: морфологические особенности и молекулярные механизмы	27
1.2.1. Структура, физико-химические свойства и функции CD95 (Fas/APO-1) рецепторов	32
1.2.2. Регуляция апоптоза антиапоптозными белками и цитокинами	33
1.3. Краткая характеристика УФ-излучения и его воздействие на клетки крови человека	39
1.4. Монооксид углерода – внутриклеточный газовый посредник	44
Глава 2. ОБЪЕКТ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	
2.1. Объект исследования	56
2.2. Методы исследования	56
2.2.1. Выделение лимфоцитов из крови доноров методом седиментации в градиенте плотности фиколл-урографина	56
2.2.2. Выделение эритроцитов из гепаринизированной крови доноров	57
2.2.3. Генерация монооксида углерода лабораторным методом	57
2.2.4. Определение концентрации монооксида углерода в эксперименте	57
2.2.5. Определение активности ионов водорода (pH) буферного раствора Хенкса в процессе инкубации нативных и СО-модифицированных лимфоцитов крови человека	58
2.2.6. Облучение УФ-светом суспензии лимфоцитов крови человека	59
2.2.7. Модификация лимфоцитов крови человека блокаторами синтеза	

белка (циклогексимидом и анизомицином) и рекомбинантным интерлейкином-2	59
2.2.8. Исследование жизнеспособности лимфоцитов крови человека	60
2.2.9. Исследование уровня экспрессии некоторых мембранных маркеров на поверхности лимфоцитов крови человека методом иммуноферментного анализа	60
2.2.10. Исследование уровня экспрессии CD95 рецептора на поверхности мембран лимфоцитов крови человека методом проточной цитофлуориметрии	62
2.2.11. Исследование поверхностной архитектоники эритроцитов крови человека	64
2.2.12. Выделение ДНК из лимфоцитов крови человека	65
2.2.13. Анализ образцов ДНК с помощью метода горизонтального электрофореза в геле	67
2.2.14. Исследование люминолзависимой хемилюминесценции лимфоцитов крови человека	69
2.2.15. Выделение митохондрий из лимфоцитов крови человека	69
2.2.16. Определение активности сукцинатдегидрогеназы (СДГ) в митохондриях лимфоцитов крови человека	70
2.2.17. Определение активности цитохром с оксидазы в митохондриях лимфоцитов крови человека	71
2.2.18. Приготовление гемолизатов эритроцитов крови человека по методу Драбкина	72
2.2.19. Определение активности глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы в гемолизате эритроцитов крови человека	72
2.2.20. Определение активности лактатдегидрогеназы (ЛДГ пр. и ЛДГ обр.) в гемолизате эритроцитов крови человека и расчет коэффициента баланса энергетических реакций	73
2.2.21. Определение содержания антиапоптозного белка Bcl-2 в лизате лимфоцитов крови человека	75

2.2.22. Определение содержания антиапоптозного белка сурвивина в лизате лимфоцитов крови человека	77
2.2.23. Статистическая обработка результатов	79
Глава 3. ИССЛЕДОВАНИЕ ВОЗДЕЙСТВИЯ МОНООКСИДА УГЛЕРОДА НА ЛИМФОЦИТЫ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА	80
3.1. Определение жизнеспособности СО-модифицированных (5÷90 мин.) лимфоцитов крови человека до и после суточного термостатирования	80
3.2. Исследование влияния монооксида углерода (5÷90 мин.) на изменение активности ионов водорода (рН) в растворе Хенкса лимфоцитов крови человека	81
3.3. Исследование влияния монооксида углерода (5÷90 мин.) на уровень экспрессии CD95 рецепторов лимфоцитов крови человека методом иммуноферментного анализа	83
3.3.1. Изучение влияния блокаторов синтеза белка на уровень экспрессии CD95 рецептора СО-модифицированных лимфоцитов крови человека	86
3.4. Исследование влияния монооксида углерода (60, 75 и 90 мин.) на уровень экспрессии CD95 рецепторов лимфоцитов крови человека методом проточной цитофлуориметрии	89
3.5. Исследование влияния монооксида углерода (5÷90 мин.) на уровень экспрессии CD8 рецепторов лимфоцитов крови человека методом иммуноферментного анализа до и после суточного термостатирования	91
3.6. Исследование структурного состояния молекул ДНК лимфоцитов крови человека после воздействия монооксида углерода (60, 75 и 90 мин.) до и после суточного термостатирования	94
3.7. Исследование люминолзависимой биохемилюминесценции лимфоцитов крови человека после воздействия монооксида углерода (60, 75 и 90 мин.) до и после их суточного термостатирования	95
3.8. Исследование активности митохондриальной сукцинатдегидрогеназы лимфоцитов крови человека после воздействия монооксида углерода	

(60, 75 и 90 мин.) до и после их суточного термостатирования	98
3.9. Исследование активности цитохром <i>c</i> оксидазы митохондрий лимфоцитов крови человека после воздействия монооксида углерода (60, 75 и 90 мин.) до и после их суточного термостатирования	100
3.10. Исследование содержания антиапоптозного белка Bcl-2 в лизате лимфоцитов крови человека после воздействия монооксида углерода (60, 75 и 90 мин.) до и после их суточного термостатирования	101
3.11. Исследование содержания Bcl-2 лимфоцитов крови человека после комплексного действия монооксида углерода (60, 75 и 90 мин.) и рекомбинантного интерлейкина-2 методом иммуноферментного анализа	103
3.12. Исследование содержания антиапоптозного белка сурвивина в лизате лимфоцитов крови человека после воздействия монооксида углерода (60, 75 и 90 мин.) до и после их суточного термостатирования	104
3.13. Исследование содержания антиапоптозного белка сурвивина лимфоцитов крови человека после сочетанного действия монооксида углерода (60, 75 и 90 мин.) и рекомбинантного интерлейкина-2 методом иммуноферментного анализа	105
Глава 4. ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ МОНООКСИДА УГЛЕРОДА НА ЭРИТРОЦИТЫ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА	107
4.1. Исследование влияния монооксида углерода (60, 75 и 90 мин.) на поверхностную архитектуру эритроцитов крови человека методом сканирующей электронной микроскопии	107
4.2. Исследование влияния монооксида углерода (60, 75 и 90 мин.) на энергетический метаболизм эритроцитов крови человека	113
4.2.1. Исследование активности лактатдегидрогеназы в прямой и обратной реакции после воздействия монооксида углерода (60, 75 и 90 мин.) на эритроциты крови человека	113
4.2.2. Исследование активности глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы после воздействия монооксида углерода (60, 75 и 90 мин.) на эритроциты крови человека	116

Глава 5. ИССЛЕДОВАНИЕ ВОЗДЕЙСТВИЯ УФ-СВЕТА НА ЛИМФОЦИТЫ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА	118
5.1. Исследование воздействия УФ-света (151, 453 и 755 Дж/м ²) на уровень экспрессии CD95 рецепторов лимфоцитов крови человека методом проточной цитофлуориметрии	118
5.2. Исследование воздействия УФ-света (151, 453 и 755 Дж/м ²) на структурное состояние ДНК лимфоцитов крови человека методом электрофореза в агарозном геле до и после их суточного термостатирования	120
5.3. Исследование люминолзависимой биохемилюминесценции лимфоцитов крови человека после воздействия УФ-света (151, 453 и 755 Дж/м ²) до и после их суточного термостатирования	122
5.4. Исследование активности митохондриальной сукцинатдегидрогеназы лимфоцитов крови человека после воздействия УФ-света (151, 453 и 755 Дж/м ²) до и после их суточного термостатирования	124
5.5. Исследование активности цитохром с оксидазы митохондрий лимфоцитов крови человека после воздействия УФ-света (151, 453 и 755 Дж/м ²) до и после их суточного термостатирования	126
5.6. Исследование содержания антиапоптозного белка Bcl-2 лимфоцитов крови человека после воздействия УФ-света (151, 453 и 755 Дж/м ²) до и после их суточного термостатирования	127
5.7. Исследование содержания антиапоптозного белка сурвивина лимфоцитов крови человека после воздействия УФ-света (151, 453 и 755 Дж/м ²) до и после их суточного термостатирования	129
Глава 6. ИССЛЕДОВАНИЕ КОМПЛЕКСНОГО ВОЗДЕЙСТВИЯ МОНООКСИДА УГЛЕРОДА И УФ-СВЕТА НА ЛИМФОЦИТЫ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА	131
6.1. Исследование комплексного воздействия монооксида углерода (60, 75 и 90 мин.) и УФ-света (151, 453 и 755 Дж/м ²) на уровень экспрессии CD95 рецепторов лимфоцитов крови человека методом проточной	

цитофлуориметрии	131
6.2. Исследование комплексного воздействия монооксида углерода (60, 75 и 90 мин.) и УФ-света (151, 453 и 755 Дж/м ²) на структурное состояние ДНК лимфоцитов крови человека методом электрофореза в агарозном геле до и после их суточного термостатирования	134
6.3. Исследование люминолзависимой биохемилюминесценции лимфоцитов крови человека после комплексного воздействия монооксида углерода (60, 75 и 90 мин.) и УФ-света (151, 453 и 755 Дж/м ²) до и после их суточного термостатирования	137
6.4. Исследование активности сукцинатдегидрогеназы митохондрий лимфоцитов крови человека после комплексного воздействия монооксида углерода (60,75 и 90 мин.) и УФ-света (151, 453 и 755 Дж/м ²) до и после их суточного термостатирования	141
6.5. Исследование активности цитохром <i>c</i> оксидазы митохондрий лимфоцитов крови человека после комплексного воздействия монооксида углерода (60,75 и 90 мин.) и УФ-света (151, 453 и 755 Дж/м ²) до и после их суточного термостатирования	143
6.6. Исследование содержания антиапоптозного белка Bcl-2 лимфоцитов крови человека после комплексного воздействия монооксида углерода (60, 75 и 90 мин.) и УФ-света (151, 453 и 755 Дж/м ²) до и после их суточного термостатирования	145
6.7. Исследование содержания антиапоптозного белка сурвивина лимфоцитов крови человека после комплексного воздействия монооксида углерода (60, 75 и 90 мин.) и УФ-света (151, 453 и 755 Дж/м ²) до и после их суточного термостатирования	148
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	150
ВЫВОДЫ	157
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	159

ПЕРЕЧЕНЬ СОКРАЩЕНИЙ, УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ,
СИМВОЛОВ И ТЕРМИНОВ

- AIF – apoptotic induced factor; апоптоз-индуцирующий фактор;
- АУФОК – аутотрансфузия УФ-облученной крови;
- ERK – extracellular signal-regulated kinase; киназа, регулирующая внешний сигнал;
- FADH₂ – флавинадениндинуклеотид;
- МАРК – mitogen-activated protein kinase; митоген-активированная протеин-киназа;
- NADH – никотинамидадениндинуклеотид;
- NO – оксид азота;
- TNF – tumor necrosis factor, фактор некроза опухолей;
- АФК – активные формы кислорода;
- ГЦ – гуанилатциклаза;
- ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота;
- ИТ – индекс трансформации;
- ИОТ/ИНОТ – индекс обратимой/необратимой трансформации;
- КБЭР – коэффициент баланса энергетических реакций;
- ЛДГ – лактатдегидрогеназа;
- НО – гемоксигеназа;
- ПКС – программируемая клеточная смерть;
- ПК G – протеинкиназа G
- ПОЛ – пероксидное окисление липидов;
- ПФОЛ – пероксидное фотоокисление липидов;
- рИЛ – рекомбинантный интерлейкин-2;
- CD – кластер дифференцировки;
- СДГ – сукцинатдегидрогеназа;
- СИФ – средняя интенсивность флуоресценции;
- СО – монооксид углерода;
- TNF- α – фактор некроза опухолей;
- УФ-излучение – ультрафиолетовое излучение;

цГМФ – циклический гуанозинмонофосфат;

ЦО – цитохром *c* оксидаза;

ЭПР – эндоплазматический ретикулум.

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность проблемы. Среди агентов, используемых для выяснения процессов биорегуляции, широкое применение нашло УФ-излучение. Последнее выступает в качестве тонкого инструмента, позволяющего исследовать молекулярные основы гомеостатических процессов организма. В свою очередь УФ-свет известен как потенциальный индуктор апоптоза в различных типах клеток, в том числе и лимфоидного ряда (В.Г. Артюхов, М.С. Трубицына, М.А. Наквасина и др. 2011; И.Ф. Лонская, В.Н. Афанасьев, В.А. Печатников, 1997; R. Caricchio, E.A. Reap, 1998).

Пристальное внимание исследователей в настоящее время направлено на изучение и анализ путей реализации процессов программируемой клеточной гибели (ПКГ) и установление молекулярных механизмов ее дизрегуляции. В норме данный процесс необходим для поддержания тканевого гомеостаза за счет удаления избыточных и функционально неполноценных клеток, нормального развития нервной и регуляции активности иммунной систем. Нарушение протекания ПКГ является важным фактором, способствующим развитию различных заболеваний организма (С.В. Thompson, 1995).

Иммунная система, ответственная за сохранение антигенного постоянства, включает большое число компонентов, одно из центральных мест среди которых занимают лимфоцитарные клетки. Выполнение ими специфических функций невозможно без осуществления коммуникации с другими клетками организма. Одним из способов передачи информации является диффузия сигнальных молекул летучих неорганических соединений (нейротрансмиттеров-газотрансмиттеров) по межклеточному пространству и их действие на рецепторы клеток-мишеней.

Среди газотрансмиттеров особый интерес представляет СО (оксид углерода (II), монооксид углерода, угарный газ). В настоящее время твердо установлено, что представления о СО только как о токсическом и смертельно опасном для организма человека соединении устарели. В норме в организме человека оксид углерода (II) образуется при деградации гемсодержащих соединений. Сейчас доказано, что СО в низких концентрациях, наравне с NO, необходим для функциони-

рования практически всех органов и тканей. Монооксид углерода вовлечен в регуляцию иммунных процессов, тонуса сосудов, передачу импульсов в головном мозге, он ингибирует в тканях провоспалительные сигнальные пути и способствует индукции антипролиферативных и антикоагуляционных механизмов (В.А Коржов, А.В. Видмаченко, 2010).

Однако, несмотря на вышесказанное, на сегодняшний день остается нерешенным вопрос об участии СО в молекулярных механизмах регуляции апоптоза клеток. Известно, что монооксид углерода обладает дуалистическим эффектом в отношении апоптотической реакции клеток. При этом конечный эффект воздействия газового мессенджера на апоптоз определяется не только типом исследуемых клеток, но и концентрацией, и временем воздействия СО на них (Wu Lingyun, Wang Rui, 2005).

В связи с вышеизложенным возникает необходимость проведения исследований, направленных на изучение молекулярно-клеточных механизмов, лежащих в основе метаболизма клеток крови человека. Это позволит в дальнейшем разработать способы управления программой апоптоза иммунокомпетентных клеток в норме и при действии внешних факторов.

Цель и задачи исследования. Целью настоящей работы явилось изучение эффектов монооксида углерода и УФ-света (240-390 нм) в дозах 151, 453 и 755 Дж/м² при их одиночном и сочетанном действии на лимфоциты и эритроциты крови человека.

Задачи работы предусматривали:

1. Исследование рецепторопосредованного пути реализации апоптоза лимфоцитов крови человека после одиночного и комплексного воздействия УФ-света и монооксида углерода;
2. Исследование структурных модификаций ДНК лимфоцитов крови человека после одиночного и комплексного воздействия УФ-света и монооксида углерода;
3. Изучение одиночного и комплексного воздействия УФ-света и монооксида углерода на активность митохондриальных ферментов – сукцинатдегидрогеназы и цитохром *c* оксидазы, ответственных за энергообеспечение иммуноцитов;

4. Выявление закономерности изменений уровня антиапоптозных белков – Bcl-2 и сурвивина – в лимфоцитах доноров после УФ-облучения и воздействия монооксида углерода;
5. Исследование энергетического метаболизма эритроцитов донорской крови и их поверхностной архитектоники после предварительной инкубации клеток с монооксидом углерода;

Научная новизна. Впервые изучены изменения уровня экспрессии некоторых мембранных рецепторов, структурного состояния ДНК, активности митохондриальных ферментов, концентрации антиапоптозных белков (Bcl-2 и сурвивина) лимфоцитарных клеток крови человека в динамике развития программируемой клеточной гибели, индуцированной воздействием УФ-света (240-390 нм) в дозах 151, 453 и 755 Дж/м² и монооксида углерода (продолжительность экспозиции – 5÷90 мин.). Установлено, что УФ-свет (151 – 755 Дж/м²) проявляет проапоптотическое действие, о чем свидетельствует повышение экспрессии CD95-рецепторов на поверхности лимфоцитов периферической крови человека, снижение электрофоретической подвижности ДНК УФ-облученных клеток, дозозависимое увеличение интенсивности спонтанной люминол-зависимой хемилюминесценции иммуноцитов, уменьшение функциональной активности митохондриальной сукцинатдегидрогеназы (СДГ) и цитохром *c* оксидазы (ЦО) лимфоидных клеток. Воздействие УФ-света в дозе 151 Дж/м² на лимфоциты способствовало снижению содержания белка Bcl-2, а в дозах 453 и 755 Дж/м² – повышению концентрации этого белка до первоначальных значений. Концентрация сурвивина в лизате иммуноцитов после облучения УФ-светом в дозах 151, 453 и 755 Дж/м² снижалась, однако, через 24 ч. измеряемый показатель существенно возрастал. Выявлено падение уровня экспрессии CD95 рецепторов (Fas-маркеров) на поверхности иммуноцитов после инкубации в атмосфере СО (60÷90 мин), отсутствие изменений в структуре ДНК, уменьшение интенсивности протекания процессов пероксидного окисления липидов в изучаемых клетках. Наблюдалось возрастание активности митохондриальной СДГ иммунокомпетентных клеток через 75 мин. воздействия СО и снижение этого показателя соответственно через сутки. Обнаружено повышение кон-

центрации антиапоптозного белка Bcl-2 через 60 и 90 мин. экспозиции лимфоцитов в атмосфере монооксида углерода, а также увеличение содержания сурвивина через 90 мин. в названных клетках. Показано, что сочетанное действие монооксида углерода и УФ-света на лимфоциты крови человека приводит к снижению чувствительности мембранных CD95-рецепторов к воздействию УФ-излучения. Выявлено, что монооксид углерода может вносить вклад в блокирование процессов перекисного окисления липидов (ПОЛ) и, как следствие, – повышать антиоксидантные свойства клетки. Воздействие УФ-света в дозах 453 и 755 Дж/м² на СО-модифицированные лимфоциты в большинстве случаев приводило к увеличению уровня антиапоптозного белка Bcl-2, однако, через сутки его содержание снижалось. УФ-свет во всех используемых дозах облучения (151, 453 и 755 Дж/м²) индуцировал возрастание концентрации сурвивина лимфоцитов, предварительно инкубированных в атмосфере СО (60÷90 мин.). Сделано заключение, что молекула СО в используемых концентрациях оказывает антиапоптотический эффект по отношению к лимфоцитам.

Выявлено, что монооксид углерода вызывает гетерогенные изменения в популяции эритроцитов. Показано, что с увеличением времени воздействия СО на эритроциты крови наблюдается появление клеток с морфологическими изменениями. Образование дискоцитов с выростами (один и более) сменяется появлением эритроцитов в виде «спущенного мяча». Установлено, что монооксид углерода изменяет активность глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы эритроцитов крови человека и приводит к нарушениям их энергетического метаболизма (угнетает активность ЛДГ в прямой реакции с параллельным увеличением ЛДГ в обратной). Отмечено выраженное смещение коэффициента энергетического метаболизма эритроцитов, что отражает метаболическую дезадаптацию, формирующуюся в условиях воздействия оксида углерода (II).

Практическая значимость. Теоретические положения диссертационной работы расширяют современные представления о характере изменения программируемой гибели лимфоцитов крови человека после воздействия УФ-света и мо-

нооксида углерода. Полученные экспериментальные данные раскрывают роль CO как вторичного посредника в регуляции апоптотической гибели лимфоцитов.

Результаты диссертационной работы используются в учебном процессе Воронежского государственного университета при проведении занятий по дисциплинам: «Биофизика», «Биофизика мембран», «Молекулярная биология и биофизика», а также в ходе выполнения выпускных квалификационных работ студентами кафедры биофизики и биотехнологии.

Апробация работы.

Материалы диссертационной работы доложены и обсуждены на IV Международной научно-практической конференции «Актуальные проблемы биологии, нанотехнологий и медицины» (Ростов-на-Дону, 2011); 4-м Всероссийском с международным участием конгрессе студентов и аспирантов-биологов «Симбиоз России 2011» (Воронеж, 2011); 2-ой Международной научной конференции «Современная биология: вопросы и ответы» (Санкт-Петербург, 2012); 4-й Международной студенческой научно-практической конференции «Интеллектуальный потенциал XXI века: ступени познания» (Новосибирск, 2010); Международной интернет-конференции «Медицина в XXI веке: традиции и перспективы» (Казань, 2012), VIII международной научно-технической конференции «Актуальные вопросы биологической физики и химии БФФХ-2012» (Севастополь, 2012); Всероссийской заочной научно-практической конференции с международным участием «Медико-биологические и педагогические основы адаптации, спортивной деятельности и здорового образа жизни» (Воронеж, 2012); 16-й Международной Пушкинской школы-конференции молодых ученых «Биология – наука XXI века» (Пушино, 2012); Международной научно-практической конференции «Дни науки-2012 г.» (Прага, 2012); IV съезде биофизиков России. Симпозиум IV «Новые тенденции и методы в биофизике» (Нижний Новгород, 2012); XII международной заочной научно-практической конференции «Научная дискуссия: вопросы математики, физики, химии, биологии» (Москва, 2013).

Публикации.

По теме диссертации опубликовано 13 статей и 3 тезисов, в том числе 3 статьи в журналах из «Перечня ВАК РФ».

На защиту выносятся следующие положения:

1. УФ-свет (240-390 нм) в дозах 151, 453 и 755 Дж/м² оказывает проапоптотическое действие на лимфоциты крови человека по рецепторопосредованному пути реализации апоптоза;
2. Монооксид углерода (время экспозиции – 60÷90 мин.) проявляет антиапоптотическое действие за счет изменения баланса антиапоптотических белков (Bcl-2, сурвивина) в лизате лимфоцитов крови доноров;
3. Монооксид углерода (время экспозиции – 60÷90 мин.) вызывает гетерогенные изменения мембраны эритроцитов крови человека и нарушает их энергетический метаболизм;
4. Схемы возможных процессов действия монооксида углерода и УФ-света на структурно-функциональное состояние и метаболизм лимфоцитов и эритроцитов крови человека.

Структура и объем работы

Диссертационная работа включает 174 страницы машинописного текста: состоит из «Введения», 6 глав, «Заключения», «Выводов». Список литературы содержит 184 источника. Иллюстративный материал включает 47 рисунков и 11 таблиц в основном тексте.

1.1. Структурно-функциональная характеристика клеток крови человека

1.1.1. Характеристика лимфоцитов крови человека, особенности их строения и метаболизма

Каждая физиологическая система выполняет в организме человека определенную функцию. Иммунная система распознает и удаляет из организма чужеродные возбудители – микробы, вирусы, грибки и даже собственные клетки и ткани, если они изменяются и становятся чужеродными под влиянием условий окружающей среды. К ним относят мутантные и опухолевые, поврежденные и состарившиеся клетки, которые могут возникнуть на протяжении всей жизни организма (А.А. Ярилин, Н.И. Шарый, 1991).

В иммунной системе выделяют центральные и периферические органы. Центральными органами являются костный мозг и тимус, периферическими – лимфоузлы, селезенка и лимфоидные скопления, которые расположены вдоль кишечника, легких и т.д. Родоначальником всех кроветворных клеток (эритроцитов, тромбоцитов, лейкоцитов, макрофагов и лимфоцитов) являются стволовые клетки, которые содержат костный мозг (А.А. Ярилин, Н.И. Шарый, 1991).

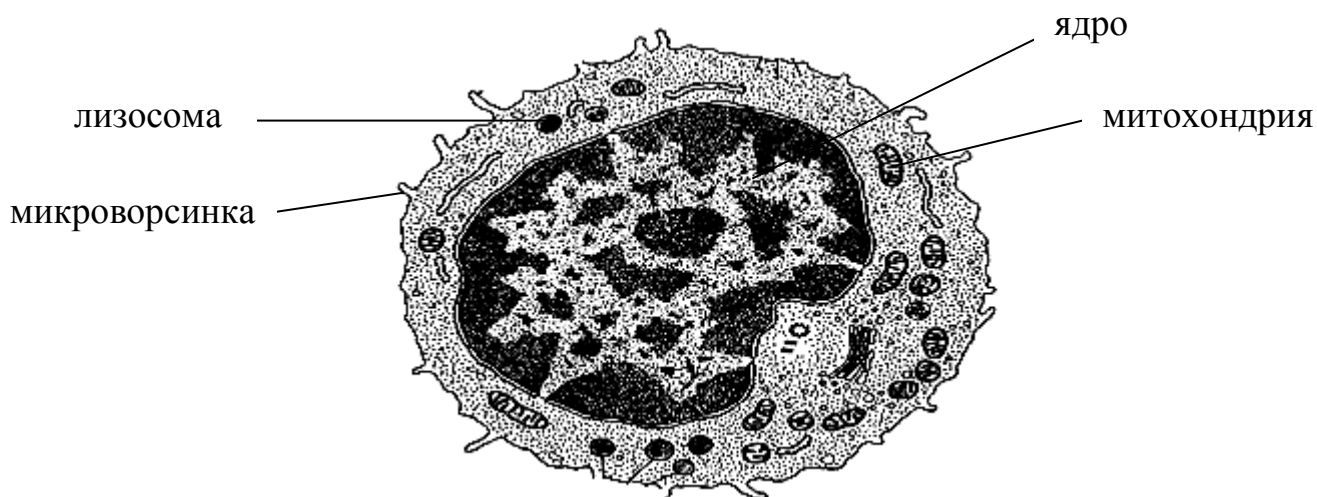
Иммунный ответ управляется лейкоцитами, которые представлены несколькими видами. Одной из важных групп лейкоцитов являются фагоцитирующие клетки: макрофаги, моноциты и полиморфноядерные нейтрофилы. Они способны на своей поверхности связывать микроорганизмы, а затем поглощать и уничтожать их. Другая, не менее важная группа лейкоцитов – это лимфоциты (А. Ройт, Дж. Бростофф, Д. Мейл, 2000).

Макрофаги и лимфоциты являются основными клетками иммунной системы, которые суммарно принято называть иммуноцитами (А.А. Ярилин, Н.И. Шарый, 1991). Организм взрослого здорового человека содержит около 10^{13} лимфоцитов, т.е. примерно каждая десятая клетка тела – лимфоцит (Р.М. Хаитов, Г.Л.

Игнатьева, И.Г. Сидорович, 2000; А.А. Ярилин, 1999). Ведущая роль во всех реакциях приобретенного иммунитета принадлежит иммуноцитам, поскольку они специфически распознают конкретный возбудитель.

При отсутствии контакта с чужеродными субстанциями лимфоциты представлены покоящимися клетками: они не вырабатывают активные продукты, не делятся, их метаболическая деятельность минимальна. Перечисленные свойства лимфоцитов выражаются в их морфологии. Это округлые клетки диаметром 7 – 9 мкм с ядром бобовидной или круглой формы, узкой цитоплазмой, бедной цитоплазматическими гранулами (Рис. 1). Ободок цитоплазмы содержит отдельные митохондрии. Ядро лимфоцита округлое с плотным хроматином (А. Ройт, Дж. Бростофф, Д. Мейл, 2000). В-лимфоциты имеют большое число митохондрий, хорошо развитый аппарат Гольджи, полирибосомы и шероховатый эндоплазматический ретикулум (В.А. Труфакин, 1983). Эти клетки являются почти бездействующими носителями рецепторов для распознавания антигенов, и лишь после связывания антигенов происходит активация лимфоцитов (А.А. Ярилин, 1999).

Рис. 1. Строение лимфоцита (А.А. Ярилин, 1999)



Популяция лимфоцитов представлена двумя типами: Т-лимфоциты (или Т-клетки) и В-лимфоциты (или В-клетки). Все лимфоциты образуются из стволовых клеток костного мозга, но Т-лимфоциты затем созревают в тимусе, тогда как В-лимфоциты заканчивают свою дифференцировку в красном костном мозге. В-клетки синтезируют поверхностные рецепторы, которые строго специфичны к

одному определенному антигену. Распознав этот антиген, В-лимфоциты размножаются и дифференцируются в плазматические клетки, которые синтезируют и выделяют рецепторные молекулы, называемые антителами. Антитела представляют собой крупные гликопротеины и находятся в крови и тканевой жидкости. Благодаря своей идентичности исходным рецепторным молекулам, они связываются с тем антигеном, который первоначально активировал В-клетки.

Существует несколько функционально различных субпопуляций Т-клеток. Одни могут взаимодействовать с В-клетками, помогая им размножаться, созревать и синтезировать антитела, другие – с моноклеарными фагоцитами, способствуя разрушению локализованных в них микроорганизмов. Обе эти субпопуляции Т-клеток названы хелперными Т-клетками. Третья субпопуляция Т-клеток способствует разрушению клеток организма, зараженных вирусами или иными патогенными внутриклеточными микробами. Данный тип активности назван цитотоксичностью, а сами клетки – цитотоксическими Т-лимфоцитами (А. Ройт, Дж. Бростофф, Д. Мейл, 2000).

Лимфоциты, препятствующие иммунному ответу – Т-супрессоры – обеспечивают внутреннюю саморегуляцию работы системы иммунитета. Функция их неоднозначная: с одной стороны, они ограничивают иммунный ответ на антиген, с другой стороны – угнетают Т-киллеры, подавляя включение В-лимфоцитов в пролиферацию, а, следовательно, угнетают выработку антител.

Т-лимфоциты являются главным участником клеточной формы иммунного реагирования. Помимо цитотоксической функции, эти клетки проявляют регуляторное воздействие на гуморальный и клеточный иммунный ответ, усиливая его, когда в реакцию вступают Т-хелперы, либо, тормозя его, когда проявляется активность Т-супрессоров (Г.Н. Дранник, 2003).

НК-клетки (естественные клетки-киллеры) представлены субпопуляцией моноклеарных клеток крови, которые лизируют неопластические и инфицированные вирусом клетки независимо от предварительной иммунизации и без каких-либо требований к совместимости по антигенам главного комплекса гистосовместимости. Их роль в организме заключается в немедленном реагировании на

вирусную инфекцию, а также, вероятно, в осуществлении противоопухолевого надзора (А.Е. Вершигора, 1990).

В структуре мембран Т- и В-лимфоцитов существенные различия выражаются в их антигенном составе. По фенотипическим маркерам Т-лимфоциты отличаются от В-клеток.

Мембрана лимфоцитов представлена классической моделью биологической мембраны, которая состоит из бислоя липидов и белков. Однако, в настоящее время установлен ряд особенностей ее строения (И.С. Фрейдлин, А.А. Тотолян, 2001).

Центральная часть липидов мембраны иммунокомпетентных клеток представлена фосфолипидами, в которых к двум гидроксильным группам глицерола присоединены эфиры жирных кислот, а третья гидроксильная группа замещена фосфатом, связанным, в свою очередь, с еще одной группой, обычно этаноламином, серином или холином. Фосфолипиды в мембране формируют двойной слой, в котором углеводородные цепи жирных кислот образуют энергетически выгодную конформацию, располагаясь перпендикулярно мембранной поверхности, где они взаимодействуют с водной средой снаружи или внутри клетки. Таким образом, образуется гидрофобная, не доступная для воды и ионов, внутренняя среда мембраны (У. Пол, 1988).

Липидные компоненты мембран играют ведущую роль в определении функциональной активности иммунокомпетентных клеток. Они выполняют ряд ее функций: подвижность, работу ионных каналов, активацию белков-эффекторов (протеинкиназы С, аденилатциклазы), выделение липидных медиаторов, резистентность мембран к цитолизу. Перечисленные выше свойства лежат в основе практики всех известных иммунологических реакций.

Лимфоциты, как и любая живая клетка, обладают определенным набором белков, липидов, углеводов, нуклеиновых кислот, ферментов. В лимфоцитах количество липидов сравнительно небольшое: от 2 до 9% сухой массы клеток (М.В. Робинсон, 1986). По активности ряда ферментов и содержанию веществ они отличаются от других клеток крови. Будучи мигрирующими клетками, они способны

отражать изменения, происходящие в организме. Это позволило Р.П. Нарциссову (Р.П. Нарциссов, 1984) сформулировать положение о том, что лимфоцит является «ферментным зеркалом» организма, отражением его обменных процессов.

В лимфоцитах обнаружены оксидоредуктазы, трансферазы, гидролазы и другие ферменты. В цитоплазме иммуноцитов выявлена активность различных дегидрогеназ, связанных с гликолизом, циклом Кребса, обменом жиров, аминокислот, пентозным циклом и транспортом электронов. Активность ферментов в лимфоцитах, принадлежности их к той или иной субпопуляции, обусловлена степенью дифференцированности лимфоцитов. Активность сукцинатдегидрогеназы, лактатдегидрогеназы, NADH-D в Т-лимфоцитах существенно не отличается от содержания этих же ферментов в В-лимфоцитах (М.В. Робинсон, 1986).

Центральным источником энергии биохимических процессов, протекающих в клетках, является аденозинтрифосфат – АТФ, которая образуется в результате присоединения остатка ортофосфорной кислоты к АДФ в ходе 2 процессов – субстратного и окислительного фосфорилирования.

В результате гликолиза осуществляется субстратное фосфорилирование – процесс, который не требует участия мембранных ферментов, в процессе которого глюкоза превращается в пируват. Затем, в аэробных условиях, пируват поступает в митохондрии с целью окисления пируватдегидрогеназой и иных ферментов цикла трикарбоновых кислот. В процессе гликолиза и цикла трикарбоновых кислот продуцируются основные биоэнергетические продукты – NADH и FADH₂, которые обеспечивают последующий синтез АТФ путем окислительного фосфорилирования.

Окислительное фосфорилирование АДФ до АТФ и окисление NADH и FADH₂ осуществляется во внутренних митохондриальных комплексах I – IV электронтранспортной дыхательной цепи с помощью АТФ-синтазы (комплекс V). В аэробных условиях большая часть АТФ синтезируется путем окислительного фосфорилирования в электронтранспортной дыхательной цепи (С. Granchi, F. Minutolo, 2012).

Дыхательная электронтранспортная цепь митохондрий представляет собой систему структурно и функционально связанных трансмембранных белков и переносчиков электронов, с помощью которой образуется достаточный запас энергии в виде АТФ в ходе окисления NADH и FADH₂ в процессе аэробного дыхания (J. Zhang, F. Frerman et al., 2006).

Дыхательная цепь митохондрий включает 4 белковых комплекса, встроенных во внутреннюю мембрану. I комплекс представлен NADH-дегидрогеназой. Функция которого заключается в окислении NADH, принятии от нее электронов и передаче на убихинон. Сукцинатдегидрогеназа, фермент класса оксидоредуктаз (КФ 1.3.5.1.) – II комплекс дыхательной электронтранспортной цепи, является связывающим звеном между циклом трикарбоновых кислот и дыхательной цепью. Главная функция СДГ – это восстановление FAD, обеспечение передачи электронов от FADH₂ к железо-серным белкам внутренней мембраны митохондрий и затем на коэнзим Q. Сукцинатдегидрогеназа – гетеротетрамерный белок, интегрированный в мембранно-белковый комплекс, который участвует в процессе окислительного фосфорилирования и в цикле трикарбоновых кислот, катализируя окисление сукцината до фумарата (K.S. Oyedotun, B.D. Lemire, 2004).

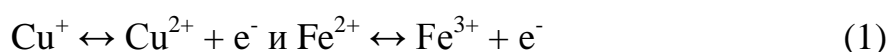
Комплекс II встроен во внутреннюю мембрану митохондрий, имеет сложную структуру и представлен 4 субъединицами, включая 2 гидрофильные – SDHA и SDHB, образуя каталитический центр энзима, и 2 гидрофобные – SDHC и SDHD (V. Yankovskaya, R. Horsefield, et al., 2003). Субъединица SDHA-флавопротеин – белок, кодируемый SDHA геном. SDHA-протеин содержит ковалентно присоединенный через остаток гистидина кофактор FAD (флавинадениндинуклеотид) и участок связывания для окисления сукцината. Главная функция SDHA состоит в превращении сукцината в фумарат, что способствует преобразованию FAD в FADH₂. Субъединице SDHB передаются электроны FADH₂. Данный белок включает 3 железо-серных (Fe/S) кофактора, через которые происходит транспорт электронов от SDHA к SDHC и SDHD и, в результате, к убихинону (V. Yankovskaya, R. Horsefield, et al., 2003).

Субъединицы SDHC и SDHD представляют собой гидрофобный димер, который окружен фосфолипидным слоем внутренней мембраны митохондрий. Они способствуют стабилизации участков связывания для убихинона, кроме того, с этими субъединицами ассоциирован также фрагмент гема.

III комплекс дыхательной цепи – коэнзим Q-цитохром *c* оксидоредуктаза – обеспечивает перенос электронов с убихинона на цитохром *C*, расположенный на внутренней мембране митохондрии. Цитохром *c* оксидаза (ЦО, К.Ф. 1.9.3.1.) – фермент класса оксидоредуктаз, катализирует конечный этап переноса электронов на кислород в процессе окислительного фосфорилирования (Л. Страйер, 1985).

IV комплекс дыхательной электротранспортной цепи митохондрий способствует передаче электронов от цитохрома на кислород с образованием воды.

Цитохром *c* оксидаза включает в себя два вида цитохромов типа aa_3 , каждый из которых образует свой центр связывания с кислородом. Гем цитохромов типа aa_3 – гем А – содержит формильную (-СОН) группу и углеводородную цепь (вместо метильной и формильной группы соответственно). Второе свойство – присутствие ионов меди в специальных белковых центрах (CuA-центры). Перенос электронов комплексом IV дыхательной цепи согласован с изменением степени окисления ионов меди и железа в составе представленного комплекса:



Этот ферментативный комплекс способствует переносу электронов непосредственно на молекулярный кислород. В конечном счете вырабатывается супероксид анион-радикал (супероксид радикал), гидропероксид-анион HO^{2-} , который, связывая протон из митохондриального матрикса, трансформируется в пероксид водорода и затем восстанавливается до воды (А.А. Терентьев, 2012). ЦО необходима для обеспечения жизнедеятельности всех эукариотических и некоторых прокариотических клеток. Нарушение биосинтеза ЦО в клетках человека приводит к их гибели.

Важные функции, совершаемые в организме человека лимфоцитами, делают их привлекательным объектом для исследователей, работающих в интересах

клеточной биологии. В связи с вышесказанным, иммунокомпетентные клетки периферической крови доноров доступны для выделения, хорошо представляют *in vitro* состояние организма в целом, в связи с чем, являются классическим объектом для иммунологических, цитологических и биофизических экспериментов.

1.1.2. Характеристика эритроцитов крови человека, особенности их строения и метаболизма

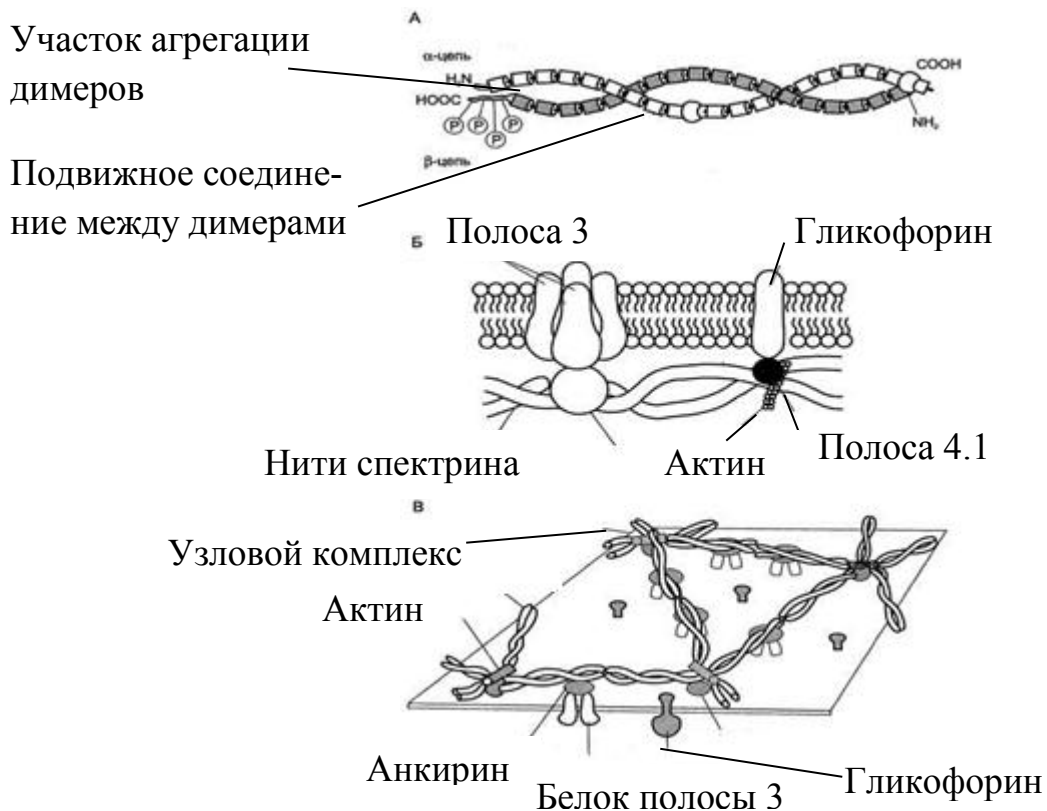
Эритроциты – высокоспециализированные безъядерные клетки двояковогнутой формы, имеющие клеточную мембрану и цитоплазму. Специализированная форма этих клеток способствует образованию большой площади поверхности по сравнению со сферическими клетками аналогичного размера, что облегчает газообмен между клеткой и внешней средой. В дополнение выше сказанного, такая форма, особенности строения их мембраны и цитоскелета гарантируют большую пластичность эритроцитов при преодолении ими мелких капилляров.

Ведущую роль в поддержании формы и способности к обратимой деформации красных клеток выполняют белки и липиды их плазмалеммы. Липидный бислой мембраны эритроцитов, так же, как и других клеток, содержит глицерофосфолипиды, сфингофосфолипиды, холестерол и гликолипиды. Повышение содержания холестерола в составе плазмалеммы способствует снижению ее текучести и эластичности, а, следовательно, и способности к обратимой деформации. Это, в свою очередь, препятствует передвижению эритроцитов через капилляры и может способствовать развитию гемостаза (Е.С. Северин, 2004).

Методом электрофореза в мембране эритроцитов обнаружено около 15 основных мембранных белков с молекулярной массой от 15 до 250 кД. Основная часть (60%) мембранных белков эритроцита представлена спектрином, гликофоорином и белком полосы 3. Гликофорин – интегральный гликопротеин – имеется только в плазмалемме эритроцитарных клеток. К N-концевой части белка, которая расположена на наружной поверхности мембраны, присоединено около 20 олигосахаридных цепей.

Спектрин представляет собой мембранный периферический белок, который нековалентно связан с цитоплазматической поверхностью липидного бислоя мембраны. Центральным белком цитоскелета эритроцитов является спектрин, представляющий собой фибриллу, которая состоит из α - и β -полипептидных цепей. Они расположены антипараллельно, перекручены между собой и нековалентно взаимодействуют во многих точках. Спектрин способен присоединяться к мембране с помощью белка анкирина. Последний взаимодействует с β -цепью спектрина и цитоплазматическим доменом белка полосы 3. Анкирин способствует фиксации спектрина на мембране, таким образом снижая скорость диффузии белка полосы 3 в липидном слое. Таким образом, на цитоплазматической поверхности эритроцитарных клеток формируется гибкая сетевидная структура, которая способствует сохранению их формы при продвижении через узкие капилляры сосудов (Рис. 2).

Рис. 2. Строение спектрина (А), околосмембранного белкового комплекса (Б) и цитоскелета эритроцитов (В) (Е.С. Северин, 2004)



Структурно-функциональную характеристику мембран эритроцитов крови можно оценить по классификации, предложенной (Г.И. Козинец, Ю. Симоврат,

1984), согласно которой с признаками эхиноцитарной трансформации (дискоциты, дискоциты с одним выростом, дискоциты с гребнем, дискоциты с множественными выростами, эритроциты в виде тутовой ягоды) относят к обратимо деформированным, а куполообразные эритроциты, сфероциты с гладкой поверхностью, сфероциты с шипиками на поверхности, эритроциты в виде «спущенного мяча», дегенеративные формы эритроцитов – к необратимо деформированным формам.

Эритроциты не имеют митохондрий, поэтому в качестве энергетического материала они используют только глюкозу. В эритроцитарных клетках катаболизм глюкозы обеспечивает поддержание структуры и функции гемоглобина, целостность мембран и образование энергии для работы ионных насосов. Глюкоза поступает в эритроциты путем облегченной диффузии. Около 90% поступающей глюкозы используется в анаэробном гликолизе, а остальные 10% – в пентозофосфатном пути (Е.С. Северин, 2004).

Конечным продуктом анаэробного гликолиза является лактат, который высвобождается в плазму крови и используется в других клетках, прежде всего в гепатоцитах.

L-лактатдегидрогеназа (КФ 1.1.1.27) – гликолитический фермент, относящийся к классу оксидоредуктаз, катализирует обратимое окисление L-лактата до пирувата с использованием в качестве кофермента NAD^+ . Молекула ЛДГ представляет собой тетрамер, состоящий из двух типов – Н и М. Молекулярные массы тетрамера и каждой субъединицы составляют 140 и 35 кДа соответственно. Рекомбинация двух типов субъединиц дает различные изоформы фермента: гомотетрамеры H_4 и M_4 и гибридные тетрамеры (гетеротетрамеры) H_3M , H_2M_2 и HM_3 . Это количество изоферментов обусловлено наличием двух генетических локусов, которые кодируют синтез субъединиц М и Н.

В субъединицах фермента имеется два домена: каталитический и центр связывания кофермента. Аминокислоты, образующие NAD^+ -связывающий домен, расположены в середине молекулы ЛДГ. Лактатдегидрогеназа связывает лактат (прямая реакция) или пируват (обратная реакция) только в присутствии кофер-

мента. NAD^+ (NADH) находятся в гидрофобной полости в изогнутой конформации молекулы ЛДГ. В каталитическом центре ЛДГ имеются полярные группы, участвующие в связывании кофермента и субстратов, и катализе: Arg 109, Arg 171, Arg 101, Glu 102, Asn 140, а также существенный остаток His 195, способный играть роль донора-акцептора H^+ в ходе реакции. Кроме того, для проявления активности фермента необходима сульфгидрильная группа, одна на субъединицу. Оптимум pH для реакции восстановления пирувата в лактат – 6,5 – 7,5, а для обратной реакции – 8,5 – 9,0 (В.Г. Артюхов, М.А. Наквасина, 2000).

Большое значение для поддержания в клетках антиоксидантного баланса и внутриклеточного восстановительного потенциала имеют реакции, которые катализируют глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа, глутатионредуктаза и каталаза. Глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа является ключевым ферментом пентозофосфатного пути окисления глюкозы. Значение этого фермента для осуществления метаболизма эритроцита чрезвычайно велико, поскольку в ходе реакций, катализируемых глюкозо-6-фосфатдегидрогеназой, образуется НАДФН, необходимый для поддержания функциональной активности и целостности эритроцита. Огромная роль НАДФН в эритроцитах заключается в регенерации окисленного глутатиона, который предотвращает денатурацию гемоглобина, предохраняет от окисления -SH группы мембранных белков красных клеток крови и обезвреживает активные формы кислорода. Снижение активности глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы приводит к дефициту НАДФН и восстановлению глутатиона, что в конечном счете ведет к раннему гемолизу эритроцитов (Ю.А. Лакомая, М.В. Колосова, Н.М. Титова, 2004).

В связи с вышесказанным, эритроциты являются высокоинформативными клетками для удобного исследования процессов изменения – как их плазмолеммы, так и ферментативного статуса после воздействия различных физико-химических факторов.

1.2. Апоптоз: морфологические особенности и молекулярные механизмы

Гибель клеток играет главную роль в формировании и функционировании многоклеточных организмов. На основании изучения морфологии гибнущих клеток J.F.R. Kerr et al. (J.F.R. Kerr, A.H. Wyllie, A.R. Currie, 1972) была предложена теория существования двух различных типов клеточной смерти – некроза и апоптоза. Для некроза характерно раннее увеличение объема клетки и субклеточных органелл с последующим аутолизом. Изменения ядер отмечаются позднее и являются следствием активации клеточных гидролаз. Некроз рассматривается как метаболическая катастрофа, которая вызвана тяжелыми молекулярными и (или) структурными повреждениями.

Термин апоптоз (программируемая клеточная смерть – ПКС) в переводе с греческого означает листья, опадающие с деревьев (Р.Н. Краммер, 2000). Как и потеря листьев осенью, ПКС является неотъемлемой частью жизни многоклеточных организмов. Однако этот элемент клеточной гибели наблюдается даже у некоторых одноклеточных (Н.К. Зенков, Е.Б. Меньщикова, Н.Н. Вольский и др., 1999).

Апоптоз выполняет центральную роль в реализации программ развития организма на всех этапах онтогенеза, а также в дифференцировке, удалении поврежденных и нефункциональных клеток, в противовирусной и противоопухолевой защите, а также поддержании гомеостаза иммунной системы (И.Н. Лаврик, 2011).

В связи с вышесказанным, неудивительно, что темп современных исследований данной проблемы в научном мире постоянно возрастает. Область применения разработок по ПКС также очень обширна. На сегодняшний день актуальным вопросом является создание молекулярной модели апоптоза, так как понимание тонких механизмов этого процесса и функциональной иерархии его составляющих чрезвычайно важно для разработок препаратов, которые смогли бы направленно модулировать ПКС и балансировать ее дисрегуляцию, являющуюся причиной огромного числа различных патологий (В.Г. Зайнулин, А.А. Москалев, 2001). В результате апоптоза не наблюдается воспалительной реакции ближайших кле-

ток на продукты распада, так как деградирующая клетка сохраняет целостность мембраны до конечных этапов процесса, в отличие от гибели клеток по пути некроза (P.R. Var, 1996). К типичным признакам апоптоза относятся: дегидратационное сжатие клеток, утрата межклеточных контактов, блеббинг, разрушение цитоскелета, конденсация хроматина, фрагментация ядра с последующей деградацией ДНК (C.D. Bortner, J.A., 2002; G.Locker, 2000). Вначале образуются крупные фрагменты ДНК, содержащие 700, 200 – 250, 50 – 70, позднее 30 – 50 тыс. пар оснований (Y. Lin, W. Ma, S. Benchimol, 2000). Затем наблюдается повышение проницаемости плазматической мембраны для небольших молекул, утрата «ворсинчатости» и образование пузыревидных вздутий, экспрессия на поверхности мембраны не обнаруживаемых в норме молекул CD95 (Fas) рецепторов и фосфатидилсерина (О.Б. Жукова, Н.В. Рязанцева, В.В. Новицкий, и др., 2007). Важным признаком апоптоза в отличие от некроза является его энергозависимость. Изменение уровня АТФ и соотношения АТФ/АДФ может определять направление клеточной гибели.

Апоптоз – достаточно быстрый процесс: весь цикл изменений клетка может пройти меньше, чем за 1 час. В целом время максимальной индукции апоптоза варьирует для разных клеток и зависит от их чувствительности к апоптотическому сигналу, микроокружения клеток, способа тестирования клеточной гибели.

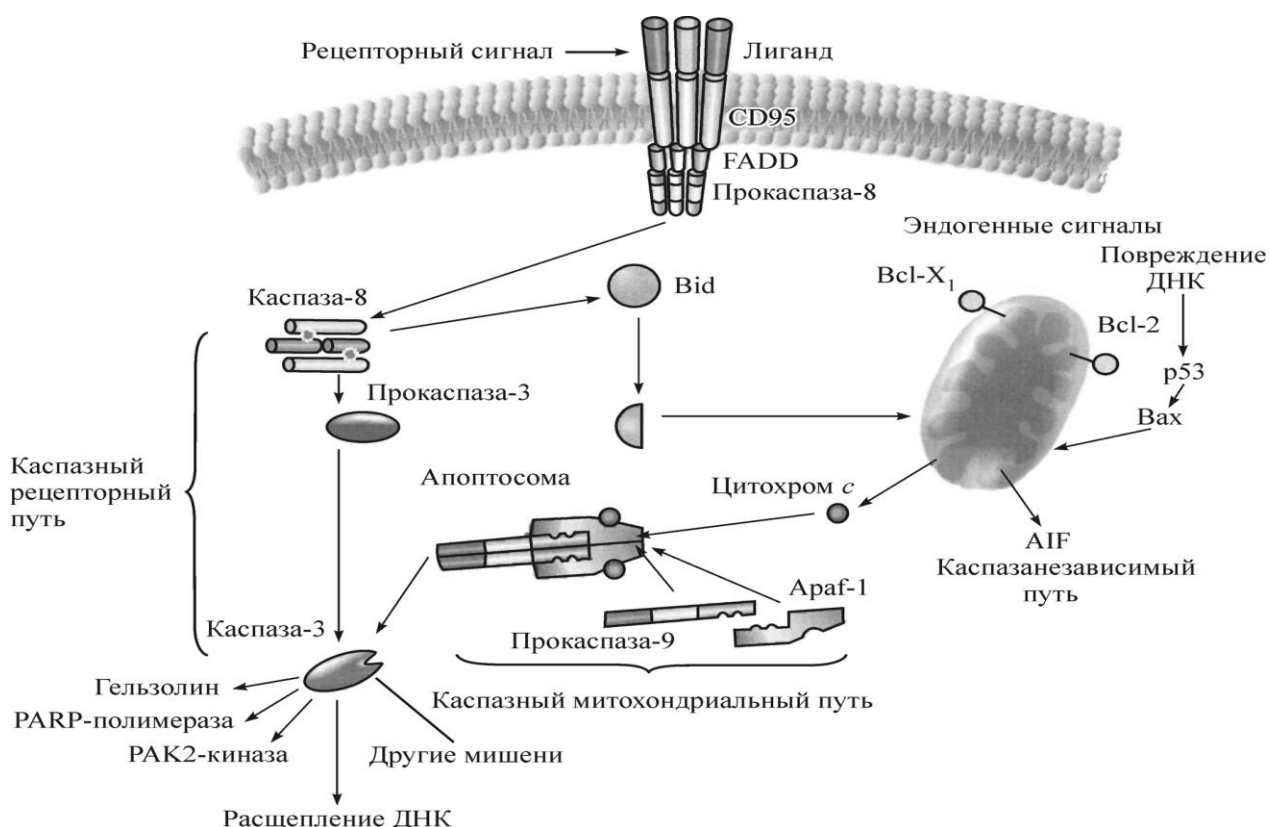
Как уже отмечалось, апоптоз играет существенную роль в развитии лимфоцитов и регуляции иммунного ответа, в том числе его Т-клеточной ветви (P.H. Krammer, 2000). Т-клеточный иммунный ответ состоит из нескольких стадий: активации Т-клеток в ответ на антигенную стимуляцию, интенсивной пролиферации или экспансии и последующего удаления лишних Т-клеток. Более 90% клеток, которые продуцируются организмом в ходе иммунного ответа, затем элиминируются, так что на периферии остается примерно одинаковое число Т-клеток. В клональной фазе иммунного ответа Т-лимфоциты устойчивы к апоптозу, однако, по завершении иммунного ответа они приобретают чувствительность к сигналам апоптоза.

В иммунной системе принято выделять три формы апоптоза: активационный апоптоз; гибель клеток вследствие дефицита факторов роста; апоптоз, вызванный глюкокортикоидами и другими агентами со сходным действием (В.Г. Артюхов, М.А. Наквасина, 2008). Активационный апоптоз встречается в зрелых активированных лимфоцитах и развивается вследствие дисбаланса активационных сигналов или в результате связывания различных рецепторов для индукторов апоптоза. Высокая устойчивость лимфоцитов к индуцированному апоптозу может привести к развитию аутоиммунных патологий.

Одним из факторов индукции апоптоза также может рассматриваться атака поврежденных клеток цитотоксическими Т-лимфоцитами, которые, помимо активации Fas-рецептора, способны синтезировать перфорин вблизи мембраны поврежденной клетки. Перфорин, полимеризуясь, формирует трансмембранные каналы, через которые в клетки проникают гранзимы, которые в свою очередь активируют каспазу-3, что запускает каспазный каскад (D.L.Vaux, S.J. Korsmeyer, 1999; D.R. Green, 1998).

Общая схема запуска и развития апоптоза представлена на рис. 3 (М.О. Hengartner, 2000; А.В. Широкова, 2007).

Рис. 3. Схема передачи сигналов при апоптозе (по: Hengartner M.O., 2000, А.В. Широкова, 2007)



Процесс апоптоза условно делят на три фазы: сигнальную (индукторную – фаза формирования и проведения апоптотических сигналов), эффекторную и деградационную (фаза экзекуции или деструкции) (М.Е. Сербин, Е.В. Щербак, 2004; В.Г. Артюхов, М.А. Наквасина, 2008). Апоптоз может инициироваться в результате развития гипоксии, гипероксии, поражения химическими или физическими агентами, перекрестного связывания соответствующих рецепторов, нарушении сигналов клеточного цикла, удалении факторов роста и метаболизма и т.д. В течение эффекторной фазы различные индуцирующие пути конвертируются в основном в один общий путь апоптоза. Фаза деградации является общей для всех инициирующих путей независимо от природы индуктора и гистогенетической принадлежности клеток.

Несмотря на разнообразие инициирующих факторов, выделяют два основных пути передачи сигнала апоптоза: рецептор-зависимый и митохондриальный путь (А.Ю. Барышников, Ю.В. Шишкин, 2002).

Способ реализации ПКС, опосредованный физиологическими индукторами, реализуется через клеточные рецепторы, которые предназначены для включения программы клеточной гибели (путь, опосредованный через «рецепторы смерти» или рецепторный или Fas-зависимый). Такой путь передачи сигнала схематически выглядит следующим образом:

индукторы → рецепторы → адаптеры → каспазы первого эшелона → регуляторы
→ каспазы второго эшелона.

Разборку цитоплазматических и ядерных компонентов клетки осуществляют специфические протеазы, в частности, каспазы – ферменты семейства цистеиновых протеиназ, кальпайны и эндонуклеазы.

Каспазы являются одними из главных «фигурантов» эффекторной фазы апоптоза. Они разъединяют белки-мишени в местах расположения аспарагиновых остатков. У человека идентифицировано 14 видов каспаз, которые разделяют по функциональным особенностям на три группы:

- активаторы цитокинов (каспазы 1, 4, 5, 13);
- иницирующие или каспазы – индукторы активации эффекторных каспаз (каспазы 2, 8, 9, 10, 12);
- эффекторные каспазы – исполнители программы апоптоза, обеспечивающие демонтаж клеточных структур (каспазы 3, 6, 7, 14).

В обычном состоянии каспазы в клетке присутствуют в неактивной форме, как проэнзимы (S. H. Kaufmann, W.C. Earnshaw, 2000; P.K. Ho, C.J. Hawkins, 2005; K. Vermeulen, D.R. Van Bockstaele, Z.N. Berneman, 2005). Каспаза 2 характеризуется иницирующими и эффекторными функциями (B. Zhivotovsky, S. Orrenius, 2005). На этапе активации иницирующих каспаз апоптоз еще может быть обратим. Прокаспазы, находясь в мономерной форме, присутствуют в клетке в латентном состоянии. Предположительно, пространственное сближение молекул прокаспаз приводит к формированию активных каспаз через механизм протеолитического само- и перекрестного расщепления. В результате этого процесса от прокаспазы (молекулярная масса 30-50 кДа) отщепляется N-концевой домен (продомен), а оставшаяся часть молекулы делится на большую (20 кДа) и малую (10

кДа) субъединицы, которые затем взаимодействуют. Два гетеродимера формируют тетрамер с двумя каталитическими участками, которые действуют независимо друг от друга. Таким образом, прокаспазы активируются и высвобождаются в цитоплазму в виде каспаз.

В настоящее время известно достаточное количество про- и антиапоптотических белковых субстратов каспаз, которые могут быть локализованы в клеточном ядре, цитоплазме, цитоскелете. Они представлены ламинами, ядерными белками, актином, гельзолином, фодрином, протеинкиназой и др. Активированные каспазы расщепляют структурные белки клетки, организуют нарушение регуляции синтеза белка, вызывают инактивацию и дизрегуляцию белков, ответственных за репликацию и репарацию ДНК, образованием мРНК. В результате гидролиза каспазами биологическая функция их субстратов может активироваться или ингибироваться. Одним из субстратов каспаз является поли(АДФ-рибозо)полимераза, играющая ведущую роль в процессах репарации ДНК, посттрансляционной модификации многих белков, регуляции активности $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -зависимой эндонуклеазы, обеспечивающей межнуклеосомное расщепление ДНК.

1.2.1. Структура, физико-химические свойства и функции

CD95 (Fas/APO-1) рецепторов

Специализированный рецептор для индукции апоптоза, обозначаемый CD95 (Fas/APO-1), сам по себе не убивает клетку, а способствует инициации апоптоза, взаимодействуя с его лигандом (FasL). При этом на клеточной мембране формируется рецепторный комплекс, называемый «сигнальным комплексом, индуцирующим клеточную смерть» (death-inducing signaling complex, DISC) (P.H. Kramer, R. Arnold, I.N. Lavric, 2007; И.Н. Лаврик, 2011). При связывании лиганда с рецептором происходит олигомеризация цитоплазматических белков, в результате чего активируется апоптозоспецифическая протеаза (каспаза-8) и развиваются характерные для апоптоза процессы. Апоптоз, инициированный через этот белок, называют Fas-зависимым.

CD95 рецептор относится к суперсемейству фактора некроза опухолей/фактора роста нервов (TNF-tumor necrosis factor). Рецепторы семейства TNF представлены трансмембранными гликопротеидами I типа с ограниченной гомологией в экстрацеллюлярном домене, которые внеклеточными участками взаимодействуют с триммерами лигандов-индукторов. При взаимодействии рецептора с лигандом образуются кластеры рецепторных молекул и связываются их внутриклеточные участки с адаптерами.

Fas-рецептор (42-52 кДа) состоит из 3 экстрацеллюлярных обогащенных цистеином доменов (157 аминокислотных остатков), трансмембранного домена из 17 аминокислотных остатков и цитоплазматического домена (145 аминокислотных остатков). Ген, кодирующий CD95, локализован в 10 хромосоме у человека. CD95 экспрессируется на поверхности многих типов клеток: активированных Т- и В-лимфоцитов, кортикальных тимоцитов, кератиноцитов, гепатоцитов, фибробластов, миелоидных клеток и других (В.Г. Артюхов, М.А. Наквасина, 2008).

1.2.2. Регуляция апоптоза антиапоптозными белками и цитокинами

Существуют регуляторы, которые блокируют или усиливают разрушительное действие каспаз первого эшелона. К ним относят белки семейства Bcl-2, в состав которого включают промоторы (Bax, Bid и Bik) и ингибиторы (собственно Bcl-2 и Bcl-XL) апоптоза. Соотношение активности этих белков обуславливает развитие запрограммированной клеточной гибели (М.О. Hengartner, 2000; A.Gross, J. M. McDonnell, S.J. Korsmeyer, 1999). Данные белки осуществляют сложный контроль за состоянием каналов митохондриальных мембран и выходом в цитозоль таких проапоптотических митохондриальных факторов, как цитохром с, AIF, Araf-1, прокаспазы-2,3,9 (J.M. Adamas, 2003; T. Dragovich, C.M. Rudin, C.B. Thompson, 1998; P.C. Kam, N.I. Ferch, 2000). Эти протеины находятся в постоянном динамическом равновесии, поэтому считается, что соотношение активных форм данных белков определяет баланс между жизнью и смертью клетки.

Семейство белков Bcl-2 включает в себя более 20 белков, разделяемых на следующие группы.

1. Антиапоптозные белки Bcl-2, Bcl-X_L, Bcl-w, Mcl-1, A1 (Bfl-1) и Bcl-2o содержат четыре консервативные последовательности, гомологичные Bcl-2 – домены BH4 (BH4 отсутствует у отдельных представителей семейства). Три из этих доменов (BH3) образуют на антиапоптозных белках гидрофобную борозду, которая служит для связывания с проапоптозными белками Bim/Nbk/Blk, Bid, Bad, Hrk/DP5, Vim/Vod, Noxa, Puma/Bbc3, Bmf и Bcl-G. Белки Bcl-2, Bcl-X_L и Bax структурно сходны: семь α -спиралей, соединенных гибкими связями (C. Borner, 2003).

2. Проапоптозные белки Bax, Bak, Bad, Mtd (Bok) и Diva содержат домены BH3, а BH4 отсутствует. Эти белки также имеют гидрофобную борозду, образованную доменами BH1-3 (H.L.A.Vieira, G. Kroemer, 1999; C. Borner, 2003).

3. Проапоптозные белки, содержащие только домен BH3, – Bim, Bid, Vim, Hrk/DP5, Blk и Bnip3, Bnip3L. Общим для этих белков служит укороченный BH3. Связь с белками-партнерами происходит благодаря взаимодействию между гидрофобной поверхностью, образуемой α -спиралью BH3, и гидрофобной бороздой антиапоптогенных белков, образуемой BH3 (T. Kuwana, M.R. Mackey, G. Perkins, 2002; E.Cheng, M.C.Wei, S. Weiler, 2001).

В покоящейся клетке про- и антиапоптозные белки семейства Bcl-2 локализованы в различных компартментах. Апоптогенные молекулы семейства Bcl-2 расположены в цитозоле – в свободном виде или связанные с цитоскелетом (J.K. Tobiume, 2005; S.Willis, C.L. Day, M.G. Hinds, D.C.S. Huang, 2003). Bax, Bak, Bcl-2 и Bcl-X_L могут взаимодействовать с двумя структурными компонентами митохондриальных пор: VDAC (Voltage-dependent anion channel) на наружной митохондриальной мембране и ANT (adenine nucleotide translocase) на внутренней мембране. Bcl-2 и Bcl-X_L запирают VDAC-каналы, через которые осуществляется выход в цитоплазму проапоптозных белков. Bax и Bak, находящиеся в цитоплазме покоящихся клеток, при апоптозе перемещаются в митохондрии, где, взаимодействуя с VDAC, стимулируют открытие каналов. Кроме того, каналы открываются

при образовании гетеродимеров Вах-Bcl-2 (R.T. Allena, M.W. Cluckb, D.K. Agrawal, 1998; T. Ohtsuka, H. Ryu, Y.A. Minamishima et al., 2004).

Семейство генов Bcl-2 локализовано у человека на хромосоме 18. Восприятие анти- или проапоптотических сигналов Bcl-2 осуществляется как на уровне генов (так, транскрипционный фактор p53 повышает экспрессию гена Вах), так и на уровне посттрансляционной модификации белков (действие цитокинов). Про- и антиапоптотическое действие активированных белков семейства Bcl-2 реализуется главным образом через модуляцию активности митохондрий.

Каспаза-8 активирует каспазы второго эшелона: в результате протеолиза из прокаспазы-3 образуется каспаза-3, и процесс гибели клетки после этого становится необратимым. Каспаза-3 способна в дальнейшем к самостоятельной активации, способствует активации ряда других протеаз семейства каспаз, факторов фрагментации ДНК, что приводит к необратимому распаду ДНК на нуклеосомные фрагменты. Такой тип передачи сигнала может наблюдаться, например, у лимфоидных клеток.

Ограничение гибели клетки может происходить с участием белков семейства IAP, которые ингибируют каспазы (C. Adrain, E.A. Slee, M.T. Harte, S.J. Martin, 1999; M. Holcik, R.G. Korneluk, 2001; M. Leist, M. Jaattela, 2001; S.P. Hessian, C.C. Harris, 2006). На N-конце все IAP-белки имеют от 1 до 3 специфических повторов, называемых BIRs (примерно по 70 аминокислот в каждом). Белок сурвивин (survivin) является одним из представителей семейства IAP-белков, участвующий в ингибировании каспаз. Его экспрессия значительно увеличивается в опухолевых клетках. Обнаружено несколько изоформ сурвивина, образующихся в результате альтернативного сплайсинга (H. Caldas, Y. Jiang, M.P. Holloway et al., 2005). Белок сурвивин – член семейства IAP белков, участвующий в контроле клеточного деления, регуляции апоптоза, ангиогенеза (R.A. Altura, R.S.Olshevski, D.V. Voie, 2000). Антиапоптотическая функция заключается в прямом или опосредованном ингибировании каспаз, например, за счет связывания сурвивина с белком SMAC (Second Mitochondria-derived Activator of Caspase). Smac/DIABLO – белок с молекулярной массой 25 кД, высвобождающийся из митохондрий в цито-

плазму при апоптозе. Этот белок – антагонист каспазоингибирующей активности IAP: связывание Smac/DIABLO с IAP освобождает каспазы из комплексов с IAP. Сурвивин селективно образуется в наиболее распространенных опухолях человека и вовлечен в резистентность опухолевых клеток к противоопухолевым агентам и ионизирующим излучениям.

Известно, что цитокины являются частью врожденного иммунитета, участвуют в иммунных реакциях нейтрофилов и других клеток миелоидного ряда (И.В. Нестерова, Н.В. Колесникова, 1999; М.П. Потапнев, 1995; К.В. Вассон, J.J. Oppenheim, 1998). Взаимодействуя со специфическими клеточными рецепторами, цитокины могут оказывать стимулирующее или подавляющее влияние на пролиферацию, дифференцировку, миграцию, эффекторную функцию клеток, жизнеспособность клеток иммунной системы (М.В. Робинсон, В.А. Труфакин, 1999; А.А. Ярилин, 2000). Выявлена большая группа цитокинов (ИЛ-2, ИЛ-3, ИЛ-4, ИЛ-10, интерферон- γ , факторы роста), при действии которых запускается эндогенная программа защиты клеток от апоптоза, опосредованная через белки Bcl-2, Bcl-x_L и др. (M. Armant, G. Delespesse, M. Sarfati, 1995; D.R. Green, D.W. Scott, 1994). Ряд цитокинов (фактор некроза опухоли α – ФНО- α), ИЛ-2, ИЛ-3, ИЛ-5, ИЛ-10) обладает способностью индуцировать апоптоз (Н.В. Рязанцева, В.В. Новицкий, Л.С. Литвинова и др., 2007; J.E. de Vries, 1995). Имеются данные о цитокинах, оказывающих двойственное влияние на реализацию танатогенной программы. К их числу принадлежат интерферон- γ , ФНО- α , ИЛ-10, ИЛ-2, ИЛ-4 и др. (М.П. Потапнев, 2002; J.E. de Vries, 1995). Факт дозозависимого влияния данных клеточных медиаторов на процесс клеточной гибели активно обсуждается современными исследователями (Н.В. Рязанцева, В.В. Новицкий, Л.С. Литвинова и др., 2007; D.R. Green, D.W. Scott, 1994). Установлено, что характер их влияния на апоптоз определяется несколькими причинами, в первую очередь типом клеток-мишеней, степенью их дифференцировки, функциональной активностью, состоянием рецепторного аппарата, а также концентрацией самих цитокиновых молекул (М.П. Потапнев, 2002; L.S. Litvinova, N.V. Ryazantseva, V.V. Novitskii, 2008). В исследованиях Чечиной О.Е и соавт. показано, что рИЛ-2 проявляет свое проапоптотиче-

ское действие в отношении лимфоцитарных клеток начиная с концентрации 0,10 нг/мл. Увеличение количества апоптотически измененных лимфоцитов сопряжено с изменением соотношения в клетке анти- и проапоптотических белков семейства Bcl-2 в пользу последних, что может свидетельствовать о причастности митохондриального пути в проведении апоптотического сигнала при действии на клетку данных цитокинов. При индукции апоптоза рекомбинантным ИЛ-2 соотношение про-и антиапоптотических белков смещается в сторону проапоптотических как за счет снижения содержания в лимфоцитах Bcl-2 и Bcl-x_L, так и увеличения количества белка Bad (О.Е. Чечина, Н.В. Рязанцева, В.В. Новицкий и др., 2011).

Второй путь реализации апоптоза – митохондриальный. В клетках, обработанных низкомолекулярными ДНК-лигандами, нередко снижается трансмембранный потенциал митохондрий $\Delta\psi$. Этот важный для апоптоза феномен – следствие открывания митохондриальных пор и повышения проницаемости митохондрий для веществ с молекулярной массой $<1,5$ кДа, что приводит к выравниванию концентраций ионов по обе стороны мембраны (L.Galluzzi, N.Larochette, N.Zamzami, G.Kroemer, 2006; S. Orrenius, V. Gogvadze, B., 2007). К факторам, стимулирующим образование пор, относятся: снижение количества восстановленного глутатиона, NADPH, АТФ и АДФ, образование активных форм кислорода (АФК), разобщение дыхания и окислительного фосфорилирования, повышение свободного Ca^{2+} в цитоплазме (E. Finkel, 2001; X. Wang, 2001). Результатом раскрытия пор служит набухание митохондриального матрикса, разрыв наружной мембраны митохондрий и высвобождение растворимых белков межмембранного объема. К этим белкам относят ряд апоптогенных факторов: цитохром *c*, прокаспазы 2, 3 и 9, белок AIF. AIF (57 кДа) является самостоятельным митохондриальным эффектором апоптоза, действующим независимо от каспаз и реализующим каспазозависимый путь ПКС. Способностью активировать каспазы и апоптоз обладает цитохром *c* в окисленном и восстановленном состояниях, медь- и цинк-замещенные производные цитохрома. Это указывает на определяющую роль апобелка, а не гема в индукции ПКС (P. Bernardi, V. Petronilli, F. Di Lisa, M. Forte, 2001).

AIF продвигается к ядру, вызывает конденсацию хроматина и разрыв ДНК с формированием крупных фрагментов. В этом случае действует каспазозависимый механизм. Таким образом, AIF и цитохром *c* играют важную роль как проапоптотические факторы (H.L.A. Vieira, G. Kroemer, 1999; J.-C. Martinou, D.R. Green, 2001).

Образование гигантских пор – не единственный механизм выхода межмембранных белков из митохондрий в цитоплазму. Предполагают, что разрыв межмембранных белков митохондрий может быть обусловлен гиперполяризацией внутренней мембраны. Освободившийся из митохондрий цитохром *c* (15 кДа) вместе с цитоплазматическим фактором APAF-1 (apoptotic protease activating factor-1) участвует в активации каспазы-9. APAF-1 – белок с молекулярной массой 130 кДа, выполняет роль арматуры, на которой происходит аутокаталитический процессинг каспазы-9. В результате чего образуется апоптосома, с молекулярной массой более 11300 кДа, которая включает в себя не менее восьми субъединиц APAF-1 (D.R. Green, J.C. Reed, 1998).

Митохондрии выполняют решающую роль в передаче апоптотического сигнала, связанного с повреждением ДНК при действии на клетку различных факторов, в частности, высокой температуры, химических агентов. Таким образом, выделяют три основных механизма, благодаря которым митохондрии регулируют процессы жизни и смерти клеток: нарушение транспорта электронов, окислительного фосфорилирования и продукции АТФ; высвобождение белков – проапоптотических факторов; образование эндогенных активных форм кислорода.

Рецепторный и митохондриальный пути интегрируют на стадии активации какой-либо каспазы. Разнообразные сигнальные пути апоптоза обеспечивают клетке резерв для запуска программы гибели клетки в условиях воздействия различных внешних и внутренних факторов.

Изучение механизмов программированной клеточной гибели лимфоцитов крови человека в настоящее время является достаточно актуальным направлением. Нарушение индукции ПКС может привести к его ингибированию, или наоборот, к излишнему активированию, что может служить важным фактором патогене-

неза различных заболеваний, в том числе связанных с реакцией иммунной системы.

1.3. Краткая характеристика УФ-излучения и его воздействие на клетки крови человека

В последнее время в клинической практике применяется оптическое излучение различного спектрального диапазона, получаемого от обычных и лазерных источников света. В связи с этим в медицине оформилась новая область – фото-медицина и ее ведущий раздел – фотоиммунология – одной из ведущих задач которой является выяснение механизмов лечебного действия света (Е.В. Волгарева, А.П. Волгарев, К.А. Самойлова, 1990).

Повышенный интерес к УФ-свету объясняется тем, что облученная аутологичная кровь при ее последующем введении в организм может оказывать мощное терапевтическое действие на различные патологические состояния организма. Метод аутотрансфузии УФ-облученной крови (АУФОК) получил широкое признание благодаря его высокой эффективности (И.Е. Ганелина, К.А. Самойлова, 1986). К настоящему времени установлено, что АУФОК сопровождается улучшением иммунологического статуса организма, который может быть следствием структурно-функциональных изменений лимфоцитов крови, индуцируемых при действии на нее УФ-света в терапевтических дозах.

УФ-излучение относится к группе излучений электромагнитной природы. Спектр электромагнитных колебаний УФ-области расположен между рентгеновскими лучами и видимым светом, занимая диапазон волн 2-400 нм с энергией кванта $125 \div 3$ эВ (В.Г. Артюхов, Т.А. Ковалева, В.П. Шмелев, 1994).

Главной особенностью УФ-излучения является то, что УФ-лучи разной длины волны поглощаются неодинаковыми по химическому составу и конформации биологическими молекулами. Для УФ-лучей характерна небольшая проникающая способность, что объясняется малой энергией квантов и интенсивным поглощением УФ-света различными биомолекулами. Совокупность вышеупомянутых

особенностей УФ-излучения, как биологического фактора, является причиной его высокой активности и того многостороннего действия, которое оно оказывает на живые организмы и биообъекты.

Биологическая мембрана клеток является внутриклеточной мишенью при действии УФ-излучения. При этом наблюдается увеличение проницаемости мембран для различных веществ, которое обусловлено нарушением ее барьерной функции, что связано в первую очередь с фотолизом липидов. Основным путем фотолиза мембранных липидов заключается в перекисном фотоокислении цепей полиненасыщенных жирных кислот фосфолипидов. Результатом такого фотоокисления является образование гидроперекисей и продуктов их дальнейшего превращения (А.Б. Рубин, 1998; Д.И. Рощупкин, В.Г. Артюхов, 1997; Д.И. Рощупкин, А.К. Аносов, М.А. Мурина и др., 1988). Образовавшиеся соединения могут индуцировать повреждения белковых молекул, ведущих к значительным изменениям структуры биомембран. Основные хромофоры белков представлены остатками серосодержащих и ароматических аминокислот: в основном триптофана и в существенно меньшей степени тирозина и фенилаланина. Представленные аминокислоты, а также цистин ответственны за функционально активное поглощение квантов света макромолекулами белков. Причем при УФ-облучении с длиной волны более 285 нм поглощение осуществляется в основном триптофаном и тирозином, а в более коротковолновой области спектра (240-260 нм) возрастает роль фотолиза цистина.

Формирование конечных стабильных фотопродуктов ароматических аминокислот предшествует созданию ряда промежуточных лабильных фотопродуктов свободнорадикальной природы. Установлено (Д.И. Рощупкин, Е.Е. Фесенко, В.И. Новоселов, 2000), что фотоионизация является основной первичной фотореакцией ароматических аминокислот в белке: происходит отрыв электрона от молекулы аминокислоты (АН) с образованием катион-радикала ($\cdot\text{АН}^+$) и сольватированного электрона (e_s) по следующей схеме:



При диссоциации катион-радикала возникает нейтральный радикал



Поглощение квантов УФ-света (254 нм) цистином сопровождается формированием свободных радикалов с локализацией неспаренного электрона на атоме серы. В результате фотолизе цистина разрываются связи-S-S- и образуются радикалы. Разрывы дисульфидной связи цистина, входящего в активный центр белка, способствуют к его фотоинаktivации, под которой понимают утрату ферментативной, гормональной, транспортной, регуляторной, иммунологической и других функции.

На сегодняшний день накоплено большое количество литературных источников (О.В. Башарина, О.В. Земченкова, В.Г. Артюхов, 2012; И.А. Лонская, В.Н. Афанасьев, В.А. Печатников, 1997; С.М. Дубова, О.В. Путинцева, В.Г. Артюхов, 2010), посвященных воздействию УФ-света различного диапазона длин волн на форменные элементы крови человека, а также отдельные звенья иммунной системы.

УФ-свет может приводить к изменениям рельефа мембран форменных элементов крови, модифицировать уровень экспрессии маркеров и антигенных детерминант, индуцировать шеддинг надмембранных комплексов, инициировать демаскировку мембранных маркеров и способствовать развитию программируемой клеточной гибели (апоптоза) (В.А. Крыленков, С.К. Григорьева, Л.М. Кукуй, А.М. Малыгин, 1982; К.А. Самойлова, Р.А. Арцишевская, К.Д. Оболенская, 1986).

Выявлено, что воздействие УФ-света (240-390 нм) в дозах 151-1359 Дж/м² вызывает изменение рецепторного профиля мембран Т- и В-лимфоцитов крови человека. Обнаружено увеличение экспрессии антигенов HLA-DR и разнонаправленная реакция Fc-рецепторов на поверхности мембран лимфоидных клеток (В.Г. Артюхов, О.В. Путинцева, Е.В. Дмитриев, 2003). Показано, что облучение УФ-светом лимфоцитов крови доноров в дозах 151-755 Дж/м² приводит к изменению структурного состояния мембран клеток, уровня экспрессии CD3, CD4, CD8, CD25 и CD19 маркеров, способствует изменению энергетического метаболизма, а также активирует апоптотическую гибель иммуноцитов (В.Г. Артюхов, О.В. Земченкова, О.В. Башарина, С.В. Рязанцев, 2013; В.Г. Артюхов, О.В. Путинцева, С.М.

Дубова, В.А. Брагина, 2013). Установлено, что УФ-свет в дозах 151 и 755 Дж/м² вызывает гибель клеток путем рецепторопосредованного апоптоза (В.Г. Артюхов, М.А. Наквасина, М.С. Трубицына и др., 2009). УФ-свет в дозах 151-906 Дж/м² оказывает иммуностимулирующее действие на Т-лимфоциты крови человека (В.Г. Артюхов, О.В. Путинцева, И.А. Колтаков и др., 2008), а в дозах 151-1359 Дж/м² вызывает перераспределение молекул антигенраспознающего рецепторного комплекса (CD3, CD4, CD8 маркеров) на поверхности Т-лимфоцитов в виде «кэппинг»-эффекта с образованием рецепторных кластеров различных типов («кэп 1/2», «кэп 1/4» и амeboидный кэп) (В.Г. Артюхов, О.В. Путинцева, В.А. Брагина и др., 2012). Т-лимфоциты способны поддерживать экспрессию CD2 и CD11a маркеров на постоянном уровне при действии широкого диапазона доз УФ-света (151-906 Дж/м²). Воздействие УФ-света в дозе 1359 Дж/м² способствует снижению экспрессии с одновременным усилением процессов кэппинга белковых молекул (Дубова С.М., 2010). Кроме того, УФ-свет активирует CD95 рецепторы смерти (Fas), экспрессирующиеся в ответ на активацию Fas-лигандов на поверхности иммунокомпетентных клеток (Y. Aragane, D. Kulms, D. Metze et al., 1998) вследствие интенсификации процессов пероксидного фотоокисления липидов, накопления АФК, изменения структурного состояния плазматических мембран клеток, а также синтеза молекул Fas-рецептора *de novo*. УФ-излучение способствует нарушению структуры мембран митохондрий, что обусловлено выходом апоптогенных факторов (цитохрома *c*, AIF) (H. Murahashi, H. Azuma, N. Zamzami et al., 2003).

Показано (В.Г. Артюхов, О.В. Земченкова, О.В. Башарина и др., 2011), что непосредственно после УФ-облучения суспензии лимфоцитов в дозах 151 и 755 Дж/м² происходит уменьшение активности ЛДГ, СДГ и ЦО. Это в свою очередь приводит к падению интенсивности аэробного и анаэробного путей окисления глюкозы, а, следовательно, снижается энергообеспечение клеток, что подтверждается уменьшением концентрации АТФ в лимфоцитах через 4 ч. после УФ-облучения.

Согласно общепринятому мнению (В.Г. Артюхов, Т.А. Ковалева, М.А. Наквасина, 2009; В.М. Osawa, K. Ferenczi, T. Kikuchi et al., 1999), ДНК – центральная внутриклеточная мишень при мутагенном и летальном действии коротковолнового УФ-излучения. Это подтверждается главным образом совпадением максимума в спектрах действия фотобиологических эффектов (260-265 нм) с максимумом в спектре поглощения ДНК.

Азотистые основания нуклеотидов являются основными хромофорами ДНК, причем квантовые выходы фотопревращений пиримидиновых компонентов примерно на порядок выше, чем пуриновых. Поглощение азотистыми основаниями квантов УФ-света (максимум поглощения – 260 нм) приводит к образованию их электронно-возбужденных синглетных и триплетных состояний, которые возникают преимущественно в результате $\pi \rightarrow \pi^*$ -переходов. Электронно-возбужденные состояния пиримидиновых оснований могут вступать в ряд фотохимических реакций (А.Б. Рубин, 1987): образование фотодимеров тимина, урацила, цитозина, смешанных димеров; гидратация цитозина и урацила; внутримолекулярные и межмолекулярные сшивки ДНК; сшивки ДНК-белок; разрывы сахарофосфатного остова нуклеиновых кислот.

Показано, что УФ-свет в диапазоне 240-390 нм в дозах 151, 1510 и 3020 Дж/м² приводит к фрагментации ДНК лимфоцитарных клеток («апоптотная лестница») (В.Г. Артюхов, М.С. Трубицына, М.А. Наквасина, 2011).

Однако на сегодняшний день остается актуальной проблема воздействия низких доз (151, 453, 755 Дж/м²) УФ-облучения на организм человека. Изменение рецепторного профиля поверхностной мембраны, энергетического метаболизма лимфоцитов крови человека, нарушение систем антиоксидантной защиты, репарации ДНК и апоптоза заставляют исследователей пересмотреть биофизические механизмы формирования эффектов воздействия терапевтических доз на иммунокомпетентные клетки доноров.

1.4. Монооксид углерода – внутриклеточный газовый посредник

В последние годы интерес исследователей сосредоточен на изучении роли газовых мессенджеров (NO, CO, H₂S), действующих в физиологических концентрациях, в регуляции программируемой гибели клеток. Нарушение реализации ПКС является важным патогенетическим фактором развития заболеваний (злокачественные образования, сахарный диабет, острые и хронические воспалительные процессы, сердечно-сосудистые и нейродегенеративные заболевания и др.). Это делает актуальным исследование, посвященные молекулярным механизмам ее дизрегуляции.

Данные молекулы обладают высокой реакционной способностью и играют важную роль в регуляции различных физиологических и патологических реакций (Н.В. Рязанцева, Е.Г. Старикова, Л.А. Таширева и др., 2012).

Существует ряд специфических свойств, характерных для газовых посредников (R. Wang, 2002). Во-первых, все известные на сегодняшний день газовые мессенджеры являются простыми молекулами. Во-вторых, эти вещества легко проникают через клеточные мембраны, а значит, их внутриклеточное действие не связано с распознаванием рецепторов. В-третьих, они образуются эндогенно с участием ферментов, что делает генерацию газов высокорегулируемым процессом. В-четвертых, внутриклеточное действие газовых посредников сопряжено с химической модификацией белков-мишеней. Стоит отметить, что газотрансмиттеры обладают также уникальной особенностью – они не накапливаются и не хранятся внутри клетки (Н.В. Рязанцева, Е.Г. Старикова, Л.А. Таширева и др., 2012).

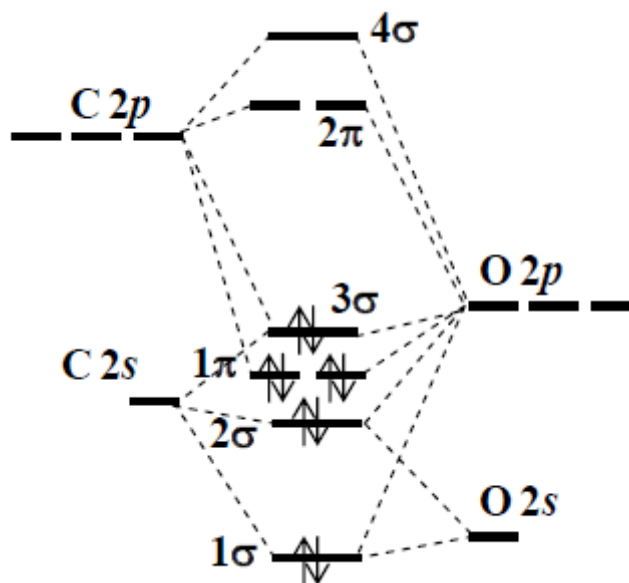
Монооксид углерода впервые был получен в 1776 г. французским исследователем Жаком де Лассоном при нагревании оксида цинка с древесным углем. Впервые вне атмосферы земли CO был обнаружен бельгийским ученым М. Мижотом в 1949 г. по наличию основной колебательно-вращательной полосы в ИК-спектре Солнца. Естественный уровень CO в атмосфере составляет 0,01-0,9 мг/м³. Время его жизни 2-4 месяца. В атмосферу CO попадает в составе вулканических и

болотных газов, при окислении метана и различных углеводородов гидроксильными радикалами и озоном, в результате пожаров и деятельности человека. Значительное количество СО образуется при фоторазложении красных, сине-зеленых и других водорослей, продуктов жизнедеятельности планктона океана, при катаболизме гемсодержащих соединений в организме человека и животных, в микроорганизмах и растениях (В.И. Коржов, А.В. Видмаченко, М.В. Коржов, 2010).

СО – это газ (молекулярная масса 28,01, плотность при 25 °С – 1,145 г/л), не имеющий запаха, цвета, вкуса, не обладающий раздражающим действием. Он является устойчивым биполярным двухатомным соединением, поглощающим излучения в ИК-области, соответствующей колебательному возбуждению основного электронного состояния молекулы. Излучение в видимой и ближней области ультрафиолетового спектров им не поглощается. СО имеет очень низкие температуры плавления (-205 °С) и кипения (-191,5 °С). В твердом состоянии он существует в виде двух модификаций (кубической и гексагональной) (Н.Л. Глинка, 1990). Оксид углерода (II) слабо растворим в воде (2,691 мг на 100 г при 23 °С и давлении 760 мм рт. ст.) и химически с ней не взаимодействует. Также он не вступает в реакции с растворами кислот и щелочей.

Строение молекулы монооксида углерода можно объяснить, используя метод молярных орбиталей (Рис. 4). В этом методе кратность связи принято определять по числу связывающих электронов, участвующих в его образовании. В молекуле СО на молекулярные орбитали переходят 2р-электрона атома кислорода и 2р-электрона атома углерода. Энергия 2р-электронов соединяющихся атомов неодинаковая. Заряд атома кислорода выше, чем углерода, так что 2р-электрона в атоме кислорода сильнее притягиваются ядром. Поэтому расположение 2р-орбиталей атома кислорода соответствует более низкой энергии по сравнению с углеродом. Все шесть электронов, участвующих в образовании связи, размещаются на трех связывающих молекулярных орбиталях.

Рис. 4. Энергетическая диаграмма уровней атомных и молекулярных орбиталей в молекуле CO (В.В. Приседский, 2009)

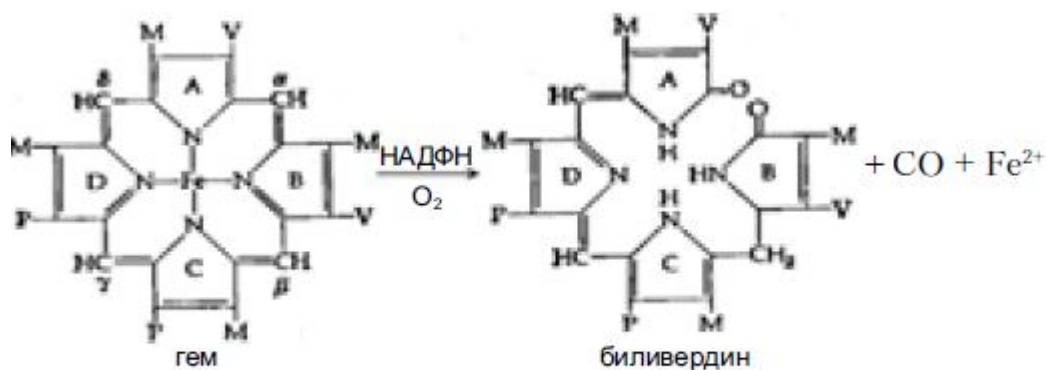


Наличие в молекуле CO шести связывающих электронов отвечает образованию тройной связи. Образование тройной связи можно объяснить методом валентных связей. За счет неспаренных электронов, имеющих в каждом из взаимодействующих атомов, в молекуле CO возникают две ковалентные связи. При этом одна из орбиталей внешнего электронного слоя углерода остается незанятой электронами. Этот атом углерода может быть акцептором электронной пары. В то же время, атом кислорода сохраняет на одной из р-орбиталей неподеленную электронную пару и обладает электронно-донорными свойствами. Так образуется еще одна ковалентная связь – донорно-акцепторная. В этой молекуле каждый из атомов имеет во внешнем слое восемь электронов (Н.Л. Глинка, 1990; В.В. Приседский, 2009). Вследствие наличия тройной связи молекула CO весьма достаточно прочная. Молекула CO слабо поляризована, электрический момент ее диполя равен $0,04 \cdot 10^{-29}$ Кл·м (направление дипольного момента $O^- \rightarrow C^+$). Ионизационный потенциал 14,0 В, силовая константа связи $k=18.6$. Оксид углерода (II) – сильный восстановитель. Однако ввиду наличия прочной связи в данной молекуле в обычных условиях он химически весьма инертен, и окислительно-восстановительные процессы с участием CO протекают быстро, но, как правило, только при высокой

температуре. Другой характерной особенностью СО является склонность к реакциям присоединения при повышенных температурах, что обусловлено валентной насыщенностью углерода в данном соединении (Н.Л. Глинка, 1990).

Ранее считалось, что монооксид углерода (СО), угарный газ, является сильнейшим ядом, и сама мысль о том, что это вещество может играть какую-либо полезную для организма роль, казалась абсурдной. Установлено (Х.М. Марков, 1996), что СО является нормальным метаболитом в организме животных и человека. В настоящее время с ним связывают большие надежды на успех в разработке новых фармакологических средств, корригирующих эти нарушенные функции. Сейчас доказано, что монооксид углерода в низких физиологических концентрациях выполняет важную роль в различных физиологических и патологических процессах (А.М. Choi, L.E. Otterbein, 2002). В более высоких концентрациях (более 20,0 мг/м³) СО токсичен для человека, вызывает кислородное голодание тканей за счет связывания с гем-содержащими белками (гемоглобином, миоглобином, цитохромами), что приводит к нарушению транспорта кислорода и тканевого дыхания за счет образования стойкого соединения – карбоксигемоглобина. Железопорфирины обладают высокой степенью сродства к СО. В настоящее время эндогенное образование СО рассматривается как общебиологический процесс, присущий всем биологическим объектам, начиная от низших растений и заканчивая человеком (В.В. Кустов, Л.А. Тиунов, 1971). В организме образуется 16,4 мкмоль СО в час. Суточная продукция СО может достигать больше 12 мл (500 мкмоль) (S.A. Loer, P. Schober, M. Kalmanowicz, L.A. Schwarte, 2009).

Основное количество СО в организме образуется при деградации гемсодержащих соединений – гемоглобина и миоглобина, а также цитохромов и ряда металлсодержащих ферментов (каталаза, пероксидаза, триптофанпирролаза, гуанилатциклаза, NO-синтаза) (Л. Страйер, 1985). Реакция протекает по уравнению:



(4)

Эти продукты выполняют важные физиологические функции, но потенциально токсичны для клеток (S. Shibahara, 2003). Несколько лет назад было установлено, что CO принимает участие в нейрональной сигнализации и модуляции сосудистого тонуса (П. П. Загоскин, 2008; F. Coseani, 2008; D. E. Stec, H.A. Drummond, T. Vera, 2008). Кроме того, CO включен в развитие некоторых патологических состояний (например, ишемии, эндотоксического шока, эксайтотоксичности) как защитный или токсический фактор. Билирубин, следующий метаболит превращений, демонстрирует интегрирующие биологические активности, такие как антиоксидантное, антимуtagenное и антикомплементарное действие (G. Marilena, 1997).

Распад гемоглобина на гем и глобин начинается уже в эритроцитах, заканчивающих свой жизненный цикл. Освободившийся гем повторно не используется. Глобин гидролизуется до составляющих аминокислот. Конверсия гема в клетках селезенки, печени и костного мозга сопровождается образованием CO, железа и биливердина, с последующим превращением последнего в билирубин. В окислительном превращении гема участвуют два фермента – гемоксигеназа и биливердинредуктаза. Гемоксигеназа, активирующаяся при фосфорилировании протеинкиназой C, катализирует реакции, приводящие к разрыву тетрапиррольного кольца с образованием CO (за счет окисления углерода в α -метиновом мостике) и биливердина. Биливердинредуктаза катализирует превращение биливердина в билирубин. Эти ферменты находятся в купферовских клетках печени, в макрофагах селезенки и других тканях, где идет деградация геминовых структур. Железо ре-

утилизируется. Желчные пигменты выводятся из организма. При катаболизме гема образуется около 80% всего эндогенного СО, а 20% образуется из других биологически активных соединений, содержащих в своем составе тетрапиррольное кольцо. К их числу относятся, в частности, каталаза, пероксидаза, цитохромы и др. (Л.А. Тиунов, В.В. Кустов, 1980).

Известны три изоформы гемоксигеназ (НО-1, НО-2, НО-3) (В.И. Коржов, А.В. Видмаченко, М.В. Коржов, 2010).

Индукцибельный изофермент НО-1 (известен как белок стрессов HSP32) играет важную роль в адаптации клеток и тканей в ответ на действие стрессорных факторов различной природы — гема и гем-производных, тяжелых металлов, липополисахаридов, окисленных липидов, пероксида водорода, цитокинов (интерлейкин-1, интерлейкин-6, интерлейкин-10, TNF- α , интерферон- γ), гипоксии, гипероксии, гипертермии, электромагнитного и ионизирующего излучений и др. Общей чертой многих из них является способность повышать содержание свободного гема в крови с последующим поступлением его в другие ткани. НО-1 рассматривают как микросомальный белок, локализованный в эндоплазматическом ретикулуме, который способен перемещаться в ядро дифференцированной астроглиальной клетки и участвовать в регуляции метаболизма гема (В. Meyns, G. Hermans, A. Wilmer et al., 2008). Он также образуется в цитоплазме, ядерном матриксе, пероксисомах и митохондриях клеток печени.

Конститутивная изоформа НО-2, имеющаяся во многих органах, определяет скорость деградации гема в норме. Максимально она представлена в нейронах гиппокампа (пирамидные и гранулярные клетки). Кроме того, она присутствует в первичных сенсорных нейронах обонятельного эпителия. НО-1, экспрессируемая в эндотелиальных и гладкомышечных клетках сосудистой стенки, контролирует образование СО, необходимого для размножения клеток и роста капилляров. В низких концентрациях СО рассматривают как фактор цитопротекции и модулятор сосудистого тонуса при гипоксии.

НО-3 также является конститутивной изоформой НО. НО-3 была обнаружена только в тканях крыс, в том числе мозга, печени, почек и селезенки. Биологическая функция НО-3 еще не совсем ясна.

НО-1 и НО-2 являются каталитически активными, а НО-3 почти лишена каталитической активности.

Микросомальная НО использует в качестве субстратов разнообразные порфириновые структуры: протогемин IX, мезогемин IX, метгемоглобин, детерогемин, α - и β -цепи гемоглобина, но не оксигемоглобин.

Выявлена прямая корреляция между образованием эндогенного СО и билирубина, между его уровнем и уровнем железа в сыворотке крови, общим содержанием гемоглобина и метгемоглобина в крови, числом эритроцитов и активностью каталазы (S.Lynch, A. Moede, 1972). При действии последней в первой реакции глюкозомонофосфатного шунта образуется НАДФ-Н, необходимый для функционирования гемоксигеназы при окислительной деградации тетрапиррольного кольца (А.И. Клиорин, Л.А. Тиунов, 1974; Л.А. Тиунов, А.И. Клиорин, М.И.Колосова, 1972).

Все это свидетельствует о том, что эндогенный СО относится к числу биологически активных метаболитов, играющих важную роль в регуляции катаболизма гема.

Однако гем не является основным источником эндогенного СО в организме. Ингибирование гемоксигеназы уменьшает образование СО в лучшем случае только на 30–50%, что дает основание думать о существовании других альтернативных источников СО. Таким альтернативным источником эндогенного образования СО в неферментативной аскорбат-зависимой системе перекисного окисления липидов являются жирные кислоты (Н. Nishibayashi, М. Ogura, М. Taguchi et al., 2009; Н. J. Vreman, D.K. Stevenson, 1995; Н. J. Vreman, R.J. Wong, С. Sanesi et al., 1998; L. Wu, R. Wang, 2005).

Эндогенное образование СО при перекисном окислении липидов происходит в различных типах клеток, в том числе мозга, почек, легких, селезенки и крови (Н. J. Vreman, D.K. Stevenson, 1995; Н. J. Vreman, R.J. Wong, С. Sanesi et al, 1998).

В биологических системах возможно также образование незначительного количества CO негемовой природы за счет фотоокисления органических соединений. Источником негемового образования CO могут служить также бактерии (P.A. Rodgers, H.J. Vreman, P.A. Dennerly et al., 1994).

Эндогенно образовавшийся CO выводится из организма преимущественно через дыхательные пути с выдыхаемым воздухом, а также путём диффузии через кожу, транспорта в растворенном состоянии с мочой и с калом. Используется также специальный механизм обратимого связывания CO гемсодержащими белковыми структурами (гемоглобин, миоглобин, цитоглобин, нейроглобин, цитохром a_3) (Л. Страйер, 1985; Р. Шмидт, Г. Тевс, 2005; T. Burmester, B. Welch, S. Reinhardt et al., 2000; E. Geuens, I. Brouns, D. Flamez et al., 2003; D. Hamdanet, L. Kigert, S. Dewilde, 2003).

Благодаря своим особенностям CO является активным участником несинаптических взаимодействий, опосредуя передачу информации на большие (по сравнению с шириной синаптической щели) расстояния. CO равномерно диффундирует от места своего синтеза и легко проникает через билипидный слой мембран любых клеток. Распространение CO лимитируется коротким временем его жизни. Он не связывается ни с какими рецепторами на поверхности клеток, а взаимодействует непосредственно с внутриклеточными белками.

Одним из уникальных свойств монооксида углерода является молекулярный механизм, за счет которого данные вещества передают сигнал. Классические мессенджеры передают сигнал по принципу каскада. Так, нейротрансмиттер воздействует на рецепторы, связанные с G-белками (GPCRs), вызывая изменение G-белка, который затем реагирует с ферментами, генерирующими циклические нуклеотиды или инозитол-1,4,5-трифосфат (IP3). Циклические нуклеотиды воздействуют на различные протеинкиназы, IP3 вызывает высвобождение ионов кальция, что приводит к изменению активности различных внутриклеточных белков. Газовые мессенджеры прямо модифицируют внутриклеточные протеины, изменяя таким образом клеточный метаболизм более быстрым способом, нежели рецепторопосредованный (Н.В. Рязанцева, Е.Г. Старикова, Л.А. Таширева и др., 2012). Ос-

новной мишенью действия СО в клетке является растворимая гуанилатциклаза – гуанозин-5-трифосфат-пирофосфатлиаза (циклизующая). Эффект СО реализуется через активацию этого фермента.

Гуанилатциклазы (ГЦ) представляют собой семейство ферментов-циклаз, катализирующих реакцию превращения гуанозинтрифосфата (ГТФ) в гуанозин-3',5'-циклофосфат (цГМФ). Они представлены во многих органах (легкие, сердце, эндотелий кишечника, сетчатка, почки, надпочечники и др.), что доказывает их участие в регуляции внутриклеточного метаболизма, опосредованное через цГМФ, среднее содержание которого в клетке составляет 10^{-7} моль/л.

Известны четыре формы ГЦ, три из них являются мембраносвязанными, наделенными свойствами рецепторов, и одна (растворимая) обнаружена в цитозоле (К.А. Lucas, G.M. Pitari, S. Kazerounian et al., 2000).

Мембраносвязанные формы ГЦ пронизывают плазматическую мембрану и включают в себя один каталитический циклазный домен. В функционально активном состоянии они образуют гомодимер, содержащий внеклеточный (на внешней поверхности плазматической мембраны) белковый рецепторный домен и внутриклеточный каталитический домен, одинаковый у разных форм фермента, разделенных одним трансмембранным доменом. Гомодимер регулируется пептидными лигандами — натрийуретическими пептидами типа ГЦ-А и ГЦ-В, термостабильным энтеротоксином, и гуанилинами типа ГЦ-С. Идентифицировано 7 подклассов мембраносвязанной ГЦ (К.А. Lucas, G.M. Pitari, S. Kazerounian et al., 2000).

Растворимая ГЦ представляет собой гетеродимерный белок, состоящий из α - и β - субъединиц, содержащий гем. Клонировано 12 типов растворимой ГЦ у разных животных.

Она может находиться как в мембраносвязанном, так и в растворенном состоянии. Соотношения этих форм фермента в различных тканях разные. В легких и печени 80% активности ГЦ находится в цитозоле, а 20% – в мембранах. В цитозоле клеток тонкого кишечника выявляется 10% активности гуанилатциклазы, а в мембранной фракции – 90%. Некоторые внеклеточные регуляторы могут влиять

на перераспределение ГЦ между цитоплазмой и мембранами. Поскольку отщепление от мембран, как правило, активирует фермент, воздействие на компартиментализацию ГЦ может быть важным регуляторным фактором, изменяющим содержание цГМФ в клетке. Связывание монооксида углерода с железом гема растворимой гуанилатциклазой сопровождается изменением конформации фермента, лежащей в основе его активации, и увеличением образования из ГТФ цГМФ, являющегося одним из важных посредников внутриклеточной передачи информации. Ему принадлежит самостоятельная роль в регуляции внутриклеточного метаболизма.

Большая часть эффектов цГМФ реализуется через цГМФ-зависимую протеинкиназу G. цГМФ переводит цГМФ-зависимую протеинкиназу G из неактивного состояния в активное, не вызывая ее диссоциации на протомеры. Активация протеинкиназы ведет к фосфорилированию регуляторных белков-мишеней в клетках возбудимых тканей и тем самым модулирует их функциональную активность. При снижении в клетке концентрации цГМФ цГМФ-зависимая протеинкиназа инактивируется (A.J. Hobbs, L.J. Ignarro, 1996; Северина И.С., 2002).

Уровень цГМФ в клетке контролируется цГМФ-фосфодиэстеразой, катализирующей ее гидролиз до 5'-нуклеотидмонофосфата. Активация этого фермента вызывает быстрое падение уровня цГМФ. Таким образом, повышение уровня эндогенного СО сопровождается активацией растворимой ГЦ и увеличением образования из ГТФ цГМФ, активацией цГМФ-зависимой протеинкиназы G и фосфорилированием ее белковых субстратов, модулирующих активность калиевых и кальциевых каналов, а также кальциевых насосов, приводя к уменьшению внутриклеточной концентрации кальция. При этом меняются не только активность, но и регуляторные и каталитические свойства многих ферментных систем, внутриклеточных структурных элементов и генетического аппарата клетки. Процессы, сопровождающиеся генерацией цГМФ в клетках, не являются специфической особенностью каких-либо специализированных клеток. Приведенные выше данные свидетельствуют о важной роли цГМФ как универсального регулятора внут-

риклеточного метаболизма в осуществлении контроля за фундаментальными клеточными процессами.

Газы NO, CO и H₂S на протяжении долгого времени были известны только своими цитотоксическими свойствами. В высоких концентрациях они ингибируют терминальный акцептор электронов митохондриальной электронно-транспортной цепи, вызывая гибель клеток от энергетического коллапса (M. Kajimura, R. Fukuda, R.M. Bateman et al., 2010). В миллимолярных и высоких микромолярных дозах эти газовые посредники действуют проапоптотически за счет нарушения функционирования митохондрий. Действуя в низких микромолярных концентрациях, могут оказывать как про-, так и антиапоптотическое действие в зависимости от клеточного типа (C.Y. Wang, M.W. Mayo, R.G. Korneluk, 1998; G. Yang, X. Sun, R. Wang, 2004; L.Wu, R. Wang, 2004; P. Pacher, J.S. Beckman, L. Liaudet, 2007).

Антиапоптотический потенциал CO был впервые продемонстрирован в экспериментальных условиях при исследовании действия этого газа на эндотелиальные клетки и β-клетки поджелудочной железы. Так, добавление в клеточные культуры экзогенного CO препятствовало TNF-индуцированному апоптозу мышечных фибробластов и эндотелиальных клеток. Подобный антиапоптотический эффект наблюдается в условиях *in vitro* при гиперэкспрессии HO-1 (P. Inguaggiato, L. Gonzalez-Michaca, A.J. Croatt et al., 2001). Показано, что в культуре эндотелиальных клеток ингибирующее влияние CO на TNF-индуцированный апоптоз может быть отменено воздействием на клетки веществом SB203580 – селективного химического ингибитора MAP-киназы p38. Было установлено, что p38 обладает проапоптотическим действием, реализующимся в частности за счет фосфорилирования транскрипционного фактора p53 (Н.В. Рязанцева, В.В. Новицкий, 2009). Показано, что CO может активировать MAP-киназу p38 для ингибирования митохондриального пути и способствовать фосфорилированию ERK MAP-киназ, удлиняющих рецепторный апоптотический путь (R. Song, Z. Zhou, P.K. Kim, 2004). Антиапоптотический эффект CO, показанный на культуре фибробластов, опосредован также активацией гуанилатциклазы. Индукция cGMP-пути в допол-

нение к MAP-киназному обеспечивает антиапоптотический эффект СО в β -панкреатических клетках (L. Gunther, P.O. Verberat, M. Naga et al., 2002). Показано, что HO-1 или СО защищает эндотелиальные клетки от TNF-опосредованного апоптоза за счет активации NF- κ B-зависимых антиапоптотических генов (B.S. Zuckerbraun, T.R. Billar, 2003). В экспериментах на изолированных митохондриях было продемонстрировано, что СО препятствует деполяризации и пермеабиллизации митохондриальных мембран, предотвращая выход в цитозоль апоптозиндуцирующих факторов (C.S. Queiroga, A.S. Almeida, P.M. Alves, 2011). Однако в экспериментах с использованием клеток линии Jurkat было показано, что СО ускоряет клеточную смерть, активированную Fas/FasL лигандом (R. Song, Z. Zhou, P.K. Kim, et al., 2004). Таким образом, СО проявляет антиапоптотическую активность в отношении целого ряда нормальных клеток организма при разных молекулярных механизмах индукции апоптоза. Этот факт позволяет предполагать наличие специфических мишеней его действия. СО может быть проапоптотическим фактором для опухолевых клеток (Н.В. Рязанцева, Е.Г. Старикова, Л.А. Таширева, 2012).

Подводя итог всему сказанному, СО – информационная молекула, которая играет важную роль в регуляции деятельности нервной, сенсорной, бронхолегочной, сердечно-сосудистой, репродуктивной, иммунной систем и метаболизма в различных органах. С учетом этого становится понятным многообразие проявлений действия эндогенного СО в виде вазорелаксирующего, противовоспалительного, антипролиферативного, антиапоптотического, противосвертывающего и других эффектов.

ГЛАВА 2. ОБЪЕКТ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Объект исследования

Объектами исследования служили лимфоциты и эритроциты крови человека.

2.2. Методы исследования

2.2.1. Выделение лимфоцитов из крови доноров методом седиментации в градиенте плотности фиколл-урографина

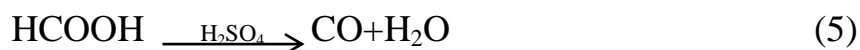
Лимфоциты выделяли из гепаринизированной крови человека в градиенте плотности фиколл-урографина ($\rho=1,077 \text{ г/см}^3$) по методу А. Воум (Д. Кэтти, 1991). Кровь в растворе Хенкса (соотношение 1:1) аккуратно наслаивали на 1 мл градиента, центрифугировали содержимое пробирки 15 мин. при 1500 об/мин. на центрифуге «MPW-340» (Польша). Методом седиментации кровь разделялась на 4 отдельные фракции: первая (нижняя) фракция на дне пробирки содержала эритроциты и фрагменты клеток крови. Следующая фракция представляла собой раствор фиколл-урографина. Выше раствора фиколл-урографина находилась суспензия лимфоидных клеток. Последний – верхний слой – содержал плазму с тромбоцитами. Лимфоциты тщательно собирали при помощи Пастеровской пипетки, перенося в другую пробирку, добавляли раствор Хенкса в соотношении 1:4. Далее пробирки центрифугировали 10 мин. при 800 об/мин., удаляли надосадочную жидкость, ресуспендировали полученный осадок в растворе Хенкса, доводя его до нужной концентрации с помощью камеры Горяева.

2.2.2. Выделение эритроцитов из гепаринизированной крови доноров

Эритроциты получали центрифугированием крови в течение 10 мин. при 600 g для получения осадка эритроцитарной массы. Затем клетки отмывали дважды от плазмы в физиологическом растворе (0,9% NaCl).

2.2.3. Генерация монооксида углерода лабораторным методом

Монооксид углерода получали лабораторным способом по химической реакции между концентрированными серной и муравьиной кислотами в колбе с закрытой крышкой и газоотводной трубкой (И.И. Грандберг, 2002).



(серная кислота выступает в роли катализатора)

Концентрированную серную и муравьиную кислоты смешивали в соотношении 1:1. Воздействие монооксида углерода на суспензию исследуемых клеток крови человека (лимфоцитов и эритроцитов) длилось 5÷60, 75 и 90 мин.

2.2.4. Определение концентрации монооксида углерода в эксперименте

Количество образовавшегося монооксида углерода определяли спектрофотометрическим методом (В.Ф. Крамаренко, Б.А. Собчук и др., 1974) по содержанию карбоксигемоглобина в крови. Для этого приготавливали следующие растворы:

Раствор А (раствор исследуемой крови): 1 мл крови вносили в мерную колбу, объемом 100 мл и добавляли фосфатный буферный раствор (pH = 7,4), доводя объем до метки.

Раствор Б (раствор крови, содержащей смесь карбоксигемоглобина и дезоксигемоглобина): готовили из раствора А в кювете спектрофотометра непосредственно перед измерением оптической плотности. К раствору А, внесенному в кювету, прибавляли 3 мг дитионита натрия ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$). В результате чего ок-

сигемоглобин и метгемоглобин восстанавливаются до дезоксигемоглобина, а карбоксигемоглобин с дитионитом натрия не вступали в реакцию.

Раствор В (раствор крови, в котором все формы гемоглобина полностью переведены в карбоксигемоглобин) получали путем пропускания монооксида углерода через раствор крови в течение 60, 75 и 90 мин.

Содержание карбоксигемоглобина в крови рассчитывали в процентах (Р) по следующей формуле:

$$P = 100 - \frac{(D_{COHb} - D_{HbCOHb})}{D_{Hb} \cdot K} \quad (6)$$

где D_{COHb} – оптическая плотность раствора В крови (при 538 нм);

D_{HbCOHb} – оптическая плотность раствора Б крови (при 538 нм);

D_{Hb} – оптическая плотность раствора Б крови в изобестической точке (при 550 нм);

К – коэффициент, равный 0,372.

Оптическая плотность растворов карбоксигемоглобина измерялась с помощью спектрофотометра «Shimadzu RF-5301 PC» (Япония). Концентрация HbCO в нативной крови составила 0,30%, а после 60 мин. пропускания CO через ее растворы она достигла значения 0,58%, через 75 мин. – 0,75%, через 90 мин. – 0,86%, что соответствует 0,002; 0,004; 0,005 и 0,006 мг/л HbCO соответственно (М.И. Калетина, 2008). Таким образом, используемые для модификации исследуемых клеток концентрации CO не превышали физиологического уровня содержания лиганда в крови здоровых лиц.

2.2.5. Определение активности ионов водорода (pH) буферного раствора Хенкса в процессе инкубации нативных и CO-модифицированных лимфоцитов крови человека

Для поддержания определенного значения pH в реакционной смеси при проведении исследований применяли буферный раствор Хенкса (pH=7,4), в котором ресуспендировали выделенные иммунокомпетентные клетки ($5 \cdot 10^5$ кл/мл) и помещали в атмосферу монооксида углерода. Пробы буферного раствора Хенкса,

содержащего нативные и СО-модифицированные лимфоциты, отбирали в пробирки типа Eppendorf через каждые 5 мин. в объеме 1 мл и измеряли активность ионов водорода (рН) при помощи рН-метра Hanna Instruments (Германия), используя микроэлектрод серии HI 1083 (при постоянном давлении (760 мм рт. ст.) и температуре (20 °С).

2.2.6. Облучение УФ-светом суспензии лимфоцитов крови человека

Суспензии нативных, СО- и УФ-модифицированных иммуноцитов в объеме 1 мл облучали светом ртутно-кварцевой лампы типа «ДРТ – 400» (Россия) через светофильтр УФС-1 с полосой пропускания 240 – 390 нм (со спектральными линиями: 253.7, 265.2, 280.0, 296.7, 302.2, 312.6 и 365.0 нм) в стеклянной термостатируемой кювете (20±1 °С) сверху при их непрерывном перемешивании магнитной мешалкой. Расстояние от оси лампы до кюветы с суспензией клеток составляло 0,23 м. Интенсивность излучения лампы – 151 Дж/м² в 1 мин. Время воздействия УФ-света на суспензию лимфоцитов составляло 1, 3 и 5 мин. (соответственно дозы облучения равнялись 151, 453 и 755 Дж/м²).

2.2.7. Модификация лимфоцитов крови человека блокаторами синтеза белка (циклогексимидом и анизомицином) и рекомбинантным интерлейкином-2

Для модификации суспензии нативных, СО- и УФ-модифицированных лимфоцитов применяли препарат рекомбинантного ИЛ-2 («PAN-Biotech», Россия), блокаторы синтеза белка – циклогексимид («Sigma», США) и анизомицин («Sigma», США) –, конечная концентрация которых в суспензиях клеток составляла 0,1 нг/мл, 10⁻⁵ моль/л и 10⁻⁶ моль/л соответственно. Инкубацию лимфоцитов в течение 24 ч. в присутствии данных модификаторов осуществляли в питательной среде RPMI-1640 при температуре 37 °С в суховоздушном термостате ТС-80М в атмосфере с 5%-ным содержанием СО₂ и 95% уровне влажности.

2.2.8. Исследование жизнеспособности лимфоцитов крови человека

Жизнеспособность лимфоцитов анализировали в тесте с красителем трипановым синим. Данный краситель проникает только через мембраны нежизнеспособных, поврежденных клеток и окрашивает их ядро (Д.К. Новиков, В.И. Новикова, 1996). Для анализа жизнеспособности СО-модифицированных лимфоцитов применяли 0,2% раствор трипанового синего в растворе Хенкса без добавления глюкозы. Краситель смешивали с суспензией иммуноцитов (соотношение 1:1) и в камере Горяева подсчитывали 100 клеток, регистрируя при этом голубые (погибшие) и неокрашенные (живые) лимфоциты. Процент жизнеспособных клеток (N) высчитывали по следующей формуле:

$$N = \left(1 - \frac{\text{число окрашенных клеток}}{\text{общее число клеток}} \right) \cdot 100 \% \quad (7)$$

2.2.9. Исследование уровня экспрессии некоторых мембранных маркеров на поверхности лимфоцитов крови человека методом иммуноферментного анализа

Иммуноферментный анализ (ИФА) или ELISA (enzyme linked immunosorbent assay) широко используется для выявления специфических антигенов на поверхности клеточной мембраны лимфоцитов крови человека. В работе мы использовали метод непрямого неконкурентного твердофазного ИФА (В.А. Егоров, 1991). Постановка метода ИФА основывается на следующих 4 принципах:

1. Большое количество антигенов способно самопроизвольно сорбироваться на поверхности лунок полистироловых планшетов (первый этап реакции ИФА). Антигены и антитела, адсорбированные на твердой фазе, не смываются буфером, тем временем неадсорбированные элементы удаляются.

2. На следующем этапе в лунках инкубируют исследуемые образцы. В это время на поверхности твердой фазы образуются иммунные комплексы. Несвязавшиеся компоненты на каждом этапе устраняются отмывающим буфером, что

допускает проведение анализа с высокой специфичностью в реакции входящего в состав конъюгата фермента с индикаторным субстратом.

3. Ферменты – пероксидаза хрена (ПХ) и щелочная фосфатаза (ЩФ) – ковалентно связываются с антигенами или антителами, сохраняя свою биологическую активность.

4. Активный центр фермента остается доступным для взаимодействия с субстратом при связывании конъюгата антитело-фермент или антиген-фермент с иммобилизованным иммунным комплексом на поверхности полистиролового планшета. Инкубация субстрата с конъюгатом приводит к появлению цветной реакции в лунках, которую прекращают на определенной стадии, а степень окрашивания оценивают по оптической плотности.

ИФА включал в себя следующие стадии:

1. В соответствующие лунки полистиролового 96-луночного планшета («МедТехник» Санкт-Петербург) вносили 100 мкл СО-модифицированных лимфоцитов крови человека в концентрации $4 \cdot 10^4$ кл/мл;

2. Инкубировали в течение 1 ч. планшет в суховоздушном термостате ТС-80М (Россия) при 37°C ;

3. Проводили двойную отмывку планшета фосфатным буфером (pH=7,2);

4. Во все лунки планшета вносили 100 мкл 0,5% раствора бычьего сывороточного альбумина (БСА), приготовленного на фосфатном буфере (pH=7,2);

5. Инкубировали в течение 1 ч. планшет в суховоздушном термостате ТС-80М (Россия) при 37°C ;

6. Проводили двойную отмывку планшета фосфатным буфером (pH=7,2);

7. Во все лунки планшета вносили 100 мкл моноклональных антител (МКА) серии LT95 и LT8, соответственно к CD95 и CD8 маркерам лимфоцитов человека («Сорбент», Москва);

8. Инкубировали в течение 1 ч. планшет в суховоздушном термостате ТС-80М (Россия) при 37°C ;

9. Проводили двойную отмывку планшета фосфатным буфером (рН=7,2);
10. Во все лунки планшета вносили 100 мкл конъюгата козьих иммуноглобулинов G, меченных пероксидазой хрена («Сорбент», Москва);
11. Инкубировали в течение 1 ч. планшет в суховоздушном термостате ТС-80М (Россия) при 37 °С;
12. Проводили двойную отмывку планшета фосфатным буфером (рН=7,2);
13. Во все лунки планшета вносили 100 мкл субстрата (0,2% раствор пероксида водорода и ортофенилендиаминдигидрохлорида (ОФД) в цитратном буфере);
14. Инкубировали планшет в течение 10 мин. в темноте при комнатной температуре (15-18 °С);
15. Во все лунки планшета вносили 50 мкл 50% серной кислоты (стоп-реагент);
16. Регистрировали оптическую плотность содержимого лунок немедленно при длине волны, равной 492 нм, на вертикальном фотометре АИФР-01 «Униплан» (Россия).

Результаты экспериментов выражали в единицах оптической плотности.

2.2.10. Исследование уровня экспрессии CD95 рецептора на поверхности мембран лимфоцитов крови человека методом проточной цитофлуориметрии

В настоящее время в лабораторной диагностике широко используются цитофлуориметрические исследования для фенотипирования мембран иммунокомпетентных клеток. Принцип проточной цитометрии состоит в следующем: через проточную ячейку под определенным давлением протекает постоянный ток изотонического раствора, называемый «обжимающим». Внутри проточной ячейки находится зонд, из которого подается образец клеток. Условия подобраны таким образом, что за счет разницы давления в зонде и «обжимающей» жидкости осу-

ществляется гидродинамическое фокусирование струи в струе, и клетки за счет этого выстраиваются друг за другом. В определенном месте клетки пересекают луч света и происходит считывание информации (Н.М. Shapiro, 1995). Метод проточной цитофлуориметрии позволяет получить информацию о рассеянии света под малыми углами ($1-10^{\circ}$) – для анализа размеров клеток, и о рассеянии света под углом 90° – для исследования соотношения размеров ядра и цитоплазмы, а также о неоднородности или гранулярности цитоплазмы образцов (С.В. Хайдуков, А.В. Зурочка, 2007). Еще одним параметром является измерение интенсивности флуоресценции изучаемого объекта. Для визуализации определенных мембранных антигенов используют специфические моноклональные антитела, конъюгированными красителем, флуоресцирующим при облучении светом с адекватной длиной волны, – флуорохромом. В качестве флуоресцентных меток используются флуоресцеинизотиоционат – ФИТЦ (возбуждение 492 нм / эмиссия 518 нм), изотиоционат родамина – РИТЦ (550 нм / 585 нм), диметиламинонафталинсульфо кислота – ДНС (340 нм / 500 нм).

Исследования проводились на базе ГУЗ «Воронежский Областной Центр по профилактике и борьбе со СПИД и инфекционными заболеваниями» с использованием проточного цитометра EPICS XL-MCL («Beckman Coulter», США). Этот прибор имеет аргоновый лазер с длиной волны 488 нм и фильтрами, центральная длина волны которых составляет 525 нм для FITC (Fluorescein Isothiocyanate). В работе использовали CD95-FITC меченные моноклональные антитела и соответствующий изотипический контроль («Beckman Coulter», США).

Фиксировали процент клеток, экспрессирующих маркеры, и среднюю интенсивность флуоресценции (СИФ), которую выражали в условных единицах (усл.ед.), соответствующих среднему каналу максимального свечения маркеров. Позитивность клеток определяли по отношению к негативному изотипическому контролю.

Лимфоцитарные клетки метили моноклональными антителами к CD95 антигену согласно методики, рекомендованной фирмой-производителем («Beckman Coulter», США). Она включала в себя следующие стадии:

1. В тестовую и контрольную пробы вносили 20 мкл моноклональных антител CD95 и изотипического контроля соответственно;
2. Вносили во все соответствующие эппендорфы с антителами и контролем по 100 мкл $2 \cdot 10^6$ кл/мл нативных или СО-модифицированных лимфоцитов, перемешивали на вортексе;
3. Инкубировали образцы в темноте при комнатной температуре (15-25 °С) в течение 15-20 мин.;
4. Вносили в каждый эппендорф 2 мл фосфатного буфера (рН=7,2), центрифугировали на центрифуге Minispin 5 мин. при 800 об/мин. (15-25 °С);
5. Удаляли надосадочную жидкость и ресуспендировали осадок в 3 мл фосфатного буфера (рН=7,2);
6. Центрифугировали в течение 5 мин. при 800 об/мин. (15-25 °С);
7. Удаляли надосадочную жидкость;
8. Ресуспендировали осадок в 0,5 мл фосфатного буфера (рН=7,2), содержащего 0,1% формальдегида;
9. Хранили образцы до анализа при 2-8 °С в темноте.

2.2.11. Исследование поверхностной архитектоники эритроцитов крови человека

Структуру нативных и СО-модифицированных эритроцитов изучали с помощью сканирующего электронного микроскопа «JSM-6380 LU» (Япония) при ускоряющем напряжении 20-25 кВ. Для этого исследуемые образцы подвергали фиксации в 2,5 % глутаровом альдегиде («Reanal», Венгрия) при температуре 4 °С в течение 1 ч. В дальнейшем производили обезвоживание клеток путем центрифугирования на центрифуге типа Minispin в течение 10 мин. при 800 об/мин. в серии водных растворов этанола восходящей концентрации (30 °, 50 °, 70 °, 90 ° и 100 °) и далее в ацетоне (Г.И. Козинец, Ю. А. Симоврат, 1984). Приготовленные вышеуказанным способом эритроцитарные клетки помещали на алюминиевую подложку и высушивали в термостате при 37 °С. Подсчет

различных морфологических форм эритроцитов проводили согласно классификации Г.И. Козинец, Ю.А. Симоврат (1984).

2.2.12. Выделение ДНК из лимфоцитов крови человека

Выделение ДНК из нативных, модифицированных монооксидом углерода и УФ-светом лимфоцитов ($2 \cdot 10^6$ кл/мл) проводили с использованием набора «ДНК-сорб-В» в соответствии с протоколом фирмы-производителя («Amplisens», ФГУН «ЦНИИЭ», Россия).

Комплект реагентов включал в себя:

Лизирующий раствор (содержит хаотропный агент – вещество, разрушающее трехмерную структуру клеточных макромолекул);

Раствор для отмывки 1 (содержит хаотропный агент и этиловый спирт);

Раствор для отмывки 2 (содержит этиловый спирт);

Сорбент универсальный (суспензия частиц силики);

ТЕ-буфер для элюции ДНК (буферный раствор для элюции ДНК).

Принцип метода основан на следующем. После СО- и УФ-модификации иммуноциты человека подвергали воздействию лизирующего раствора в присутствии частиц сорбента. В результате этого осуществляется деструкция клеточных мембран, биополимерных комплексов, а также высвобождение молекулы ДНК. ДНК в присутствии лизирующего раствора связывается с частицами сорбента, в свою очередь другие компоненты лизированного материала присутствуют в растворе и удаляются центрифугированием с последующей отмывкой. При прибавлении раствора для элюции ДНК к сорбенту осуществляется переход ДНК с поверхности силики в раствор, который отделяется центрифугированием. Используя данный метод, получают высокоочищенный препарат ДНК, который свободен от ингибиторов реакции амплификации.

Анализ выделения молекулы ДНК из нативных, СО- и УФ-модифицированных клеток крови человека включал в себя следующие стадии:

1. Для полного растворения кристаллов лизирующего раствора и раствора для отмывки их предварительно помещали в термостат (температура 65 °С);
2. В соответствующие пробирки типа Eppendorf прибавляли 300 мкл лизирующего раствора;
3. В соответствующие пробирки с лизирующим раствором прибавляли 100 мкл суспензии нативных, СО- и УФ-модифицированных лимфоцитов в концентрации $2 \cdot 10^6$ кл/мл;
4. Исследуемые образцы аккуратно перемешивали на вортексе и выдерживали в течение 5 мин. при температуре 65 °С;
5. Центрифугировали содержимое пробирок в течение 5 с при 5 тыс. об/мин. на микроцентрифуге типа Minispin («Eppendorf AG», Германия);
6. Для дальнейшего выделения ДНК использовали надосадочную жидкость, перенося ее в другую пробирку;
7. Аккуратно ресуспендировали сорбент на вортексе;
8. В каждую пробирку прибавляли 25 мкл ресуспендированного сорбента;
9. Перемешивали на вортексе, оставляли в штативе 2 мин., повторно перемешивали и оставляли в штативе на 5 мин. (при комнатной температуре 15-18 °С);
10. Сорбент осаждали в пробирках центрифугированием при 5 тыс. об/мин. в течение 30 с;
11. Надосадочную жидкость выбрасывали;
12. Вносили в соответствующие пробы 300 мкл раствора для отмывки 1, перемешивали на вортексе до полного ресуспендирования сорбента;
13. Осаждали сорбент в процессе центрифугирования при 5 тыс. об/мин. на микроцентрифуге в течение 30 с;
14. Надосадочную жидкость выбрасывали;
15. Добавляли в соответствующие пробы 500 мкл раствора для отмывки 2, перемешивали на вортексе до полного ресуспендирования сорбента универсального;
16. Центрифугировали 30 с при 10 тыс. об/мин. на микроцентрифуге;

17. Надосадочную жидкость выбрасывали;
18. Повторяли процедуру отмывки, согласно п. 8;
19. Для подсушивания сорбента пробирки с образцами помещали в термостат при температуре 65 °С на 5 – 10 мин.;
20. Затем во все пробирки прибавляли 50 мкл ТЕ-буфера для элюции ДНК;
21. Перемешивали на вортексе и помещали в термостат при температуре 65 °С на 5 мин., периодически встряхивая на вортексе;
22. Центрифугировали пробирки при 12 тыс. об/мин. в течение 1 мин. на микроцентрифуге;
23. Надосадочная жидкость содержала очищенные молекулы ДНК лимфоцитов крови человека.

2.2.13. Анализ образцов ДНК с помощью метода горизонтального электрофореза в геле

Электрофорез на протяжении последних десятилетий традиционно занимает важное место при исследовании белков и нуклеиновых кислот. Метод позволяет разделить макромолекулы по размерам, вторичной структуре, пространственной конфигурации, заряду, что в сочетании с простотой и удобством в использовании делает его незаменимым не только для качественного, но и для количественного анализа макромолекул.

В основе метода электрофореза лежат следующие основные принципы. В составе всех нуклеиновых кислот присутствуют химические группы, обладающие в водном растворе электрическим зарядом. Величина общего заряда такой молекулы определяется количеством заряженных групп, их природой, а также кислотностью раствора (рН). Так, в нуклеиновых кислотах в широком диапазоне рН на каждую фосфатную группу приходится заряд -1. При воздействии внешнего электрического поля заряженные молекулы в зависимости от их суммарного заряда перемещаются к катоду или аноду. При движении молекулы в электрическом поле ее подвижность зависит от заряда, силы сопротивления среды и характера рас-

творителя. Наиболее распространенным видом зонального электрофореза в настоящее время является электрофорез в агарозном геле. Гели агарозы образуются в результате связывания в пространственную сетку пучков нитей, за счет формирования водородных связей между ними. Средний размер пор 2%-ного геля агарозы примерно соответствует размеру биополимера с массой 50 млн. дальтон (А.М. Поляничко, 2007).

Приготовление геля проводили следующим образом: 1000 мг агарозы нагревали в 49 мл 50 ммоль/л ТАЕ-буфера (pH=8,5). Остудив раствор до 50-60 °С, выливали его в форму, поместив в нее гребенку для образования лунок. После застывания геля гребенку убрали, а форму с гелем располагали в горизонтальной электрофоретической камере Mini-Sub Cell GT («BioRad», США). Затем камеру заполняли ТАЕ-буфером (pH=8,5) так, чтобы гель находился под слоем буфера толщиной 1 – 2 мм.

Пробы ДНК приготавливали следующим образом: смешивали 4 мкл исследуемой ДНК с 1 мкл ТАЕ-буфера. Вносили пробы в соответствующие лунки геля, осуществляли электрофорез при постоянном напряжении (6,4 В/см) в течение 30 мин. По истечении времени гель помещали на 1 мин. в раствор, содержащий 0,5 мг/мл бромида этидия. Затем гель промывали в дистиллированной воде и осматривали его в УФ-свете, используя систему гель-документирования («Helicon», Россия).

Размеры фрагментов ДНК иммунокомпетентных клеток при проведении электрофореза в агарозном геле определяли с помощью Mass Ruler™ ДНК-маркера («Fermentas», США), который представляет собой набор из 9 ДНК-фрагментов длиной 1500, 2000, 2500, 3000, 4000, 5000, 6000, 8000, 10000 пар нуклеотидов (п.н.). Электрофоретическую подвижность фракций ДНК лимфоцитов рассчитывали с помощью флуоресцентной линейки УФ-прозрачного лотка геля, используемого при постановке эксперимента.

2.2.14. Исследование люминолзависимой хемилюминесценции лимфоцитов крови человека

Об интенсивности процессов пероксидного окисления липидов нативных и СО-модифицированных лимфоцитов до и после УФ-облучения судили по уровню спонтанной (нестимулированной) люминол-зависимой хемилюминесценции (Ю.А. Владимиров, 2000). Регистрацию проводили в течение 60 с на биохемилюминометре «БХЛ-06М» (Россия), оценивали максимальную интенсивность и светосумму хемилюминесценции исследуемых образцов лимфоцитов. С этой целью полистироловую кювету с исследуемыми иммунocyтaми в интактном и модифицированном состоянии ($5 \cdot 10^5$ кл/мл) вносили в измерительную камеру люминометра, затем в суспензию добавляли люминол (100 мкл, $2,5 \cdot 10^{-4}$ моль/л) и проводили запись хемилюминесценции.

2.2.15. Выделение митохондрий из лимфоцитов крови человека

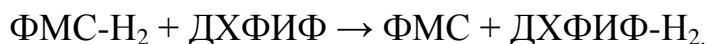
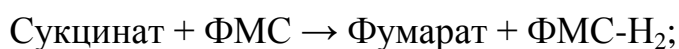
Для получения суспензии митохондрий лимфоцитов крови человека супернатант иммунocyтoв ($1 \cdot 10^6$ клеток/мл) смешивали в соотношении 1:1 с дистиллированной водой и помещали в холодильник на 30 мин. По прошествии этого времени центрифугировали при 6000 об/мин. на центрифуге MiniSpin в течение 10 мин. для осаждения мембран лимфоцитов. Затем добавляли к полученному супернатанту иммунocyтoв в соотношении 1:4 сахарозную (0,25 моль/л) среду выделения, содержащую 0,2 моль/л Трис-НСl и 1 моль/л ЭДТА (pH=7,4). Для удаления не полностью разрушенных клеток и ядер центрифугировали в течение 10 мин. при 7400 об/мин. Для осаждения митохондрий надосадочную жидкость центрифугировали при 14000 об/мин. 15 мин. В работе по выделению митохондрий использовали центрифугу с охлаждением «Jouan MR 23i» (США) (4°C).

Для выявления максимальной активности ферментов, локализованных в митохондриальном пространстве или на внутренней поверхности мембран, мито-

хондрии разрушали непосредственно перед анализом с помощью неионного детергента тритона X-100: к осадку митохондрий добавляли 0,5 мл 0,1% раствора тритона X-100 и выдерживали на холоде в течение 30 мин. (М.И. Прохоров, 1982).

2.2.16. Определение активности сукцинатдегидрогеназы в митохондриях лимфоцитов крови человека

Активность СДГ определяли методом, основанном на использовании искусственных акцепторов электронов (Т.Г. Соопер, 1969).



Среда определения представляла собой 0,1 моль/л натрий-фосфатного буфера (рН=7,4), содержащего 0,08 моль/л дихлорфенолинфенола (ДХФИФ), 1 ммоль/л феназинметасульфата (ФМС), 2 ммоль/л азиды натрия и 20 ммоль/л сукцината натрия. Активность фермента оценивали спектрофотометрически на спектрофотометре «Shimadzu UV-2401 PC» (Япония) по уменьшению оптической плотности среды при длине волны 600 нм в течение 1 мин., обусловленному обесцвечиванием ДХФИФ в ходе его восстановления. В состав реакционной смеси входили следующие компоненты: к 10 мл натрий-фосфатного буфера добавляли 4,59 мг ФМС, 0,35 мг ДХФИФ, 1,95 мг азиды натрия, 81 мг сукцината натрия. Растворы готовили непосредственно в день определения активности митохондриального фермента СДГ.

В опытную пробу добавляли 200 мкл среды определения и 100 мкл разрушенных митохондрий лимфоцитов, в контроль – 100 мкл 0,1% раствора тритона X-100.

Активность СДГ (А) высчитывали по следующей формуле:

$$A = \frac{V \cdot \Delta D}{\varepsilon \cdot l \cdot v \cdot t}, \quad (8)$$

где V – общий объем реакционной смеси (300 мкл);

l – толщина кюветы (0,4 см);

ε – молярный коэффициент экстинкции ДХФИФ – $2,1 \cdot 10^4$ л·моль⁻¹·см⁻¹;

v – объем пробы (100 мкл);

t – время (1 мин.);

ΔD – разность между оптической плотностью контрольной и опытной проб.

Митохондриальную активность СДГ иммунокомпетентных клеток исследовали как в контрольных образцах, так и непосредственно после СО-модифицирования (60, 75 и 90 мин.), УФ-облучения (151, 453 и 755 Дж/м²) и через 24 ч. инкубации в термостате.

2.2.17. Определение активности цитохром *c* оксидазы в митохондриях лимфоцитов крови человека

Каталитическую активность цитохром *c* оксидазы регистрировали по скорости окисления цитохрома *c*, по методу I.P. Schwitzguebel, P.A. Siegenthaler (1984). Для определения начальной оптической плотности в спектрофотометрическую кювету помещали 200 мкл 0,1% раствора тритона X-100 и 100 мкл 0,1 ммоль/л раствора цитохрома *c*, на спектрофотометре «Shimadzu RF-5301 PC» (Япония) измеряли начальную оптическую плотность (D_1) при длине волны 550 нм. На втором этапе измерения в кювету добавляли 200 мкл 0,1 моль/л натрий-фосфатного буфера (рН=7,4) и 100 мкл разрушенных митохондрий (п.2.2.15.), регистрируя конечную оптическую плотность (D_2). Каталитическую активность цитохром *c* оксидазы (A) выражали в мкмоль/л·мин согласно формуле:

$$A = \frac{V \cdot \Delta D}{\varepsilon \cdot l \cdot v \cdot t}, \quad (9)$$

где V – общий объем реакционной смеси (300 мкл);

l – толщина кюветы (0,4 см);

ε – молярный коэффициент экстинкции цитохрома *c* при 550 нм, равный – 21,84 л·моль⁻¹·см⁻¹;

v – объем пробы (100 мкл);

t – время (1 мин.);

ΔD – разность между оптической плотностью контрольной и опытной проб.

Митохондриальную активность цитохром *c* оксидазы иммунокомпетентных клеток исследовали как в контрольных образцах, так и непосредственно после СО-модифицирования (60, 75 и 90 мин.), УФ-облучения (151, 453 и 755 Дж/м²) и через 24 ч. инкубации в термостате.

2.2.18. Приготовление гемолизатов эритроцитов крови человека по методу Драбкина

Эритроциты гемолизировали по методу Драбкина (D. Drabkin, 1949). Гепаринизированную кровь центрифугировали 10 мин. при 3000 об/мин. Плазму отбирали, взвесь эритроцитов отмывали 2 раза физиологическим раствором (0,9 % NaCl) при 800 об/мин. в течение 10 мин. до тех пор, пока не оставалось видимых следов гемолиза. Затем к осадку эритроцитов (300 мкл) приливали 1200 мкл холодной дистиллированной воды (разведение в 4 раза), оставляли на 30 мин. при $t = 4^{\circ}\text{C}$. Затем центрифугировали при 3000 об/мин. в течение 10 мин. Далее в работе использовали центрифугат (строму отбрасывали).

2.2.19. Определение активности глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы в гемолизате эритроцитов крови человека

В гемолизатах нативных и СО-модифицированных эритроцитов определяли активность фермента глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы по методу Кочетова Г.А. (Г.А. Кочетов, 1980), применяя спектрофотометрический анализ. Принцип метода основан на определении количества восстановленного NADP·H, образующегося при окислении глюкозо-6-фосфата в фосфоглюколактон. По мере образования

NADP·H светопоглощение пробы при длине волны, равной 340 нм, возрастает. Для анализа оптической плотности в спектрофотометрическую кювету (СФ-2000, Россия) помещали 2900 мкл 0,1 М раствор натрий-фосфатного буфера (рН=7,4), 100 мкл 0,6 мМ раствора NADP, 50 мкл 15 мМ раствора глюкозо-6-фосфата и 20 мкл исследуемого гемолизата нативных и СО-модифицированных эритроцитарных клеток. Аккуратно перемешивали содержимое пробы и анализировали против дистиллированной воды увеличение оптической плотности при длине волны 340 нм в течение 1 мин.

Расчет активности глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы (А) проводили по следующей формуле:

$$A = \frac{V \cdot \Delta D}{\varepsilon \cdot l \cdot v \cdot t}, \quad (10)$$

где V – общий объем реакционной смеси (3700 мкл);

l – толщина кюветы (1 см);

ε – молярный коэффициент экстинкции NADP·H при 340 нм, равный $6,22 \cdot 10^6$ л·моль⁻¹·см⁻¹;

v – объем пробы (20 мкл);

t – время (1 мин.);

ΔD – разность между оптической плотностью контрольной и опытной проб.

2.2.20. Определение активности лактатдегидрогеназы

(ЛДГ пр. и ЛДГ обр.) в гемолизате эритроцитов крови человека и расчет коэффициента баланса энергетических реакций

Активность фермента лактатдегидрогеназы эритроцитов крови человека в прямой реакции оценивали по скорости окисления молочной кислоты, что сопровождается восстановлением NAD. За ходом реакции следили спектрофотометрически по изменению оптической плотности при длине волны 340 нм (Г.А. Кочетов, 1980). Для определения активности фермента в кювету спектрофотометра СФ-2000 (Россия) помещали 2650 мкл 0,1 М раствора

глицинового буфера (рН=10,0), 150 мкл 0,5 М лактата натрия, 150 мкл 20 мМ раствора NAD, 50 мкл гемолизата нативных или СО-модифицированных эритроцитарных клеток. Перемешивали содержимое кюветы и измеряли увеличение оптической плотности против кюветы с дистиллированной водой при 340 нм в течение 1 мин. сначала без добавления NAD, а затем в присутствии кофермента.

Определение активности фермента лактатдегидрогеназы в обратной реакции проводили по скорости восстановления пирувата, которое сопровождается окислением NAD·Н. В спектрофотометрическую кювету (СФ-2000, Россия) помещали 2450 мкл дистиллированной воды, 300 мкл 1 М раствора калий-фосфатного буфера (рН=7,4), 100 мкл 23 мМ раствора пирувата натрия, 100 мкл 5мМ раствора NAD·Н, 50 мкл гемолизата эритроцитов до и после нахождения эритроцитов в атмосфере оксида углерода (II). Перемешивали содержимое кюветы и измеряли уменьшение оптической плотности против кюветы с дистиллированной водой при 340 нм в течение 1 мин. сначала без добавления NAD·Н, а затем в присутствии кофермента.

Расчет активности лактатдегидрогеназы в прямой и обратной реакции (А) проводили по следующей формуле:

$$A = \frac{V \cdot \Delta D}{\varepsilon \cdot l \cdot v \cdot t}, \quad (11)$$

где V – общий объем реакционной смеси (3000 мкл);

l – толщина кюветы (1 см);

ε – молярный коэффициент экстинкции NADP·Н при 340 нм, равный $6,22 \cdot 10^6$ л·моль⁻¹·см⁻¹;

v – объем пробы (50 мкл);

t – время (1 мин.);

ΔD – разность между оптической плотностью контрольной и опытной проб.

Для получения интегральной оценки состояния рассматриваемого звена энергетического метаболизма был произведен расчет коэффициента баланса энергетических реакций (КБЭР) (А.К. Мартусевич, А.Г. Соловьева, 2013; А.Г.

Соловьева, Ю.В. Зимин, 2013). Расчет данного показателя проводился по следующей формуле:

$$\text{КБЭР} = \frac{\text{ЛДГ пр.2}}{\text{ЛДГ обр.2}} \cdot 100, \quad (12)$$

где ЛДГ пр. – активность ЛДГ в прямой реакции;

ЛДГ обр. – активность ЛДГ в обратной реакции.

2.2.21. Определение содержания антиапоптозного белка Vcl-2 в лизате лимфоцитов крови человека

Количественное определение содержания антиапоптозного белка Vcl-2 в лизате лимфоцитов крови человека проводили с применением набора «Протеин Vcl-2», («BenderMedSystems», Австрия) согласно инструкции фирмы-производителя, используя «сэндвич»-метод иммуноферментного анализа.

Реагенты, входящие в состав набора:

1. 96-луночный микропланшет, покрытый мышиными моноклональными антителами к белку Vcl-2;
2. Биотиновый конъюгат моноклональных Vcl-2 антител;
3. Конъюгат стрептавидина с пероксидазой хрена;
4. Стандарт Vcl-2, лиофилизированный, 64 нг/мл;
5. Разбавитель образцов;
6. Промывающий раствор (ФСБ с 1% твином 20);
7. Рабочий буфер (ФСБ с 1% твином 20 и 10% БСА);
8. Лизирующий буфер;
9. Субстратный раствор 3,3',5,5'-тетраметилбензидина (ТМБ);
10. Стоп-раствор (1 М фосфорная кислота);

Анализ включал в себя следующие стадии:

1. Приготавливали клеточный лизат нативных и модифицированных образцов: для этого осадок клеток ($5 \cdot 10^6$ кл/мл) получали центрифугированием

(800 об/мин., в течение 10 мин.), отбирали супернатант и добавляли в эквивалентном соотношении лизирующий буфер;

2. Инкубировали клетки при комнатной температуре в течение 60 мин. при аккуратном встряхивании;

3. Переносили экстракт в пробирки типа Eppendorf и центрифугировали при 1000 об/мин. в течение 15 мин. на центрифуге Minispin;

4. Отбирали лизат лимфоцитов крови человека в чистые пробирки;

5. Лунки планшета промывали 2 раза 400 мкл промывочного буфера на ячейку, удаляя полностью жидкость между промывками;

6. Вносили 100 мкл рабочего буфера в лунку, предназначенную для бланка (контроля);

7. Вносили 80 мкл разбавителя образцов в лунки, предназначенные для образцов;

8. Вносили 20 мкл каждого образца в лунки, предназначенные для образцов;

9. Добавляли 50 мкл биотинового конъюгата во все лунки;

10. Закрывали планшет пленкой и инкубировали 2 ч. при комнатной температуре (18 – 25 °С) при встряхивании 100 об/мин. на шейкере;

11. Снимали пленку и удаляли содержимое ячеек;

12. Промывали все лунки 3 раза так же, как в п. 5;

13. Вносили 100 мкл стрептавидина-HRP во все лунки, включая бланк;

14. Закрывали планшет пленкой и инкубировали 1 ч. при комнатной температуре (18 – 25 °С) при встряхивании 100 об/мин. на шейкере;

15. Снимали пленку и удаляли содержимое лунок;

16. Промывали все лунки 3 раза так же, как в п. 5;

17. Вносили 100 мкл субстратного раствора ТМБ во все ячейки;

18. Инкубировали при комнатной температуре (18 – 25 °С) в темноте в течение 10 мин. на шейкере, установленном на 100 об/мин.;

19. Добавляли 100 мкл стоп-раствора во все лунки, включая «Бланк», чтобы полностью инактивировать фермент в ячейках;

20. Оптическую плотность системы измеряли немедленно после внесения стоп-реагента при 450 нм против «Бланка»;

Расчет концентрации Vcl-2 производили по калибровочной кривой и выражали в нг/мл. Полученный результат умножали на коэффициент разведения, т.к. образцы в ходе анализа были разбавлены в 5 раз.

2.2.22. Определение содержания антиапоптозного белка сурвивина в лизате лимфоцитов крови человека

Количественное определение содержания антиапоптозного белка сурвивина в лизате лимфоцитов крови человека проводили набором «Human total Survivin», («Enzo Life Science», США) согласно инструкции фирмы-производителя, используя «сэндвич»-метод иммуноферментного анализа.

Реагенты, входящие в состав набора:

1. 96-луночный планшет, покрытый мышиными моноклональными антителами, специфичными к сурвивину;
2. Антитела к человеческому сурвивину;
3. Конъюгат кроличьего Ig G с пероксидазой хрена;
4. Стандарт сурвивина, лиофилизированный, 500 пг/мл;
5. Разбавитель образцов;
6. Промывающий раствор;
7. Рабочий буфер концентрированный (0,137 М NaCl, 2,7 мМ KCl, 8,1 мМ Na₂(PO₄)₃, 1,5 мМ K₂(PO₄)₃, 1% БСА, pH = 7,3) – во время работы разводился;
8. Лизирующий буфер (1 мМ ЭДТА, 6 М мочевины, 0,5% Тритон X-100, 0,005% фосфатного буфера) с добавлением Phenylmethyl Sulfonyl Fluoride («Sigma», США) и Protease inhibitor cocktail («Sigma», США) в соотношении 1:6;
9. Субстратный раствор (раствор 3,3,5,5-тетраметилбензидина (ТМБ) и пероксид водорода);
10. Стоп-раствор (1 н соляная кислота);

Анализ включал следующие стадии:

1. Приготавливали клеточный лизат нативных и модифицированных образцов: для этого осадок клеток ($5 \cdot 10^6$ кл/мл) получали центрифугированием (800 об/мин., в течение 10 мин.), отбирали супернатант и добавляли в эквивалентном соотношении лизирующий буфер;
2. Инкубировали клетки при комнатной температуре в течение 60 мин. при аккуратном встряхивании;
3. Переносили экстракт в пробирки типа Eppendorf и центрифугировали при 1000 об/мин. в течение 15 мин. на центрифуге Minispin;
4. Отбирали лизат лимфоцитов крови человека в чистые пробирки;
5. Вносили 100 мкл стандарта в лунку для соответствующих стандартных образцов;
6. Вносили 100 мкл каждого образца в лунки, предназначенные для образцов;
7. Инкубировали 1 ч. при комнатной температуре ($18 - 25$ °C) при встряхивании 500 об/мин. на шейкере;
8. Удаляли содержимое лунок;
9. Лунки планшета промывали 4 раза 400 мкл промывочного буфера на лунку, полностью удаляя жидкость между промывками;
10. Вносили в лунки 100 мкл конъюгата кроличьего Ig G с пероксидазой хрена;
11. Закрывали планшет пленкой и инкубировали 30 мин. при комнатной температуре ($18 - 25$ °C) при встряхивании 500 об/мин. на шейкере;
12. Снимали пленку и удаляли содержимое лунок;
13. Промывали все ячейки 4 раза как в п. 9;
14. Вносили 100 мкл субстратного раствора ТМБ во все лунки;
15. Инкубировали при комнатной температуре ($18 - 25$ °C) в темноте в течение 30 мин. на шейкере, установленном на 500 об/мин.;
16. Добавляли 100 мкл стоп-раствора во все лунки, включая «Бланк», чтобы полностью инактивировать фермент в ячейках;

17. Оптическую плотность системы измеряли немедленно после внесения стоп-реагента при 450 нм против «Бланка»;

Вычисление средней оптической плотности анализируемых образцов производили по разности между оптической плотностью пробы и «Бланка». Расчет концентрации сурвивина производили по калибровочной кривой и выражали в пкг/мл.

2.2.23. Статистическая обработка результатов

Обработку результатов экспериментов проводили с помощью прикладной программы Microsoft Excel: определяли среднее значение показателей, стандартное отклонение и доверительный интервал. Достоверность различий контрольных и опытных значений сравниваемых показателей рассчитывали по t-критерию Стьюдента при 5 %-ном уровне значимости вероятности ошибки.

Глава 3. ИССЛЕДОВАНИЕ ВОЗДЕЙСТВИЯ МОНООКСИДА УГЛЕРОДА НА ЛИМФОЦИТЫ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА

3.1. Определение жизнеспособности СО-модифицированных (5÷90 мин.) лимфоцитов крови человека до и после суточного термостатирования

Оценка жизнеспособности популяции лимфоцитов крови человека после воздействия монооксида углерода необходима для выяснения эффективности функционирования клеток *in vitro* в условиях эксперимента. Под понятием «жизнеспособность» следует понимать способность клеток поддерживать состояние, необходимое для выполнения свойственных им специализированных функций.

В связи с вышесказанным, нами был изучен уровень жизнеспособности лимфоцитов крови человека после воздействия монооксида углерода в различном диапазоне времени (5÷90 мин.) до и после суточного термостатирования при 37 °С. Выявлено, что уровень жизнеспособности нативных лимфоцитов составил $98,0 \pm 1,0\%$, а после 24 ч. нахождения их в термостате – $96,0 \pm 2,0\%$ (Табл. 1).

Показано, что уровень жизнеспособности лимфоцитов, подвергшихся инкубации в атмосфере монооксида углерода в течение 90 мин., статистически значительно уменьшался до $85,7 \pm 5,8\%$. После 24-ч. термостатирования данных образцов исследуемый параметр снижался до величины $80,0 \pm 1,0\%$. Таким образом, доля погибших клеток после 90-мин. экспозиции в атмосфере оксида углерода (II) составила 12,3%; а после их суточного термостатирования – 16,0%. Опираясь на полученные результаты, можно заключить, что при инкубации лимфоцитов крови человека в атмосфере монооксида углерода в диапазоне времени 5÷90 мин. не происходит значительной гибели популяции клеток (87,7% остается жизнеспособной).

Таблица 1. Уровень жизнеспособности СО-модифицированных лимфоцитарных клеток человека до и после их суточного термостатирования

Время инкубации	Уровень жизнеспособности СО-модифицированных лимфоцитов крови человека, (%)	Уровень жизнеспособности СО-модифицированных лимфоцитов крови человека после суточного термостатирования, (%)
контроль	98,0±1,0	96,0±2,0
5 мин.	94,3±2,4*	85,0±2,0*
10 мин.	93,0±2,0*	89,0±5,9*
15 мин.	87,0±3,0*	92,0±3,9*
20 мин.	92,7±4,6*	93,0±1,0*
25 мин.	90,7±2,4*	88,0±7,8*
30 мин.	88,0±3,0*	87,5±4,9*
45 мин.	89,3±1,3*	90,0±1,0*
60 мин.	88,0±8,2*	82,5±4,9*
75 мин.	88,7±8,6*	84,5±1,0*
90 мин.	85,7±5,8*	80,0±1,0*

* – отклонения исследуемого показателя относительно контроля статистически значимы

В связи с полученными результатами можно констатировать, что монооксид углерода в физиологических концентрациях не вызывает гибели лимфоцитов крови человека.

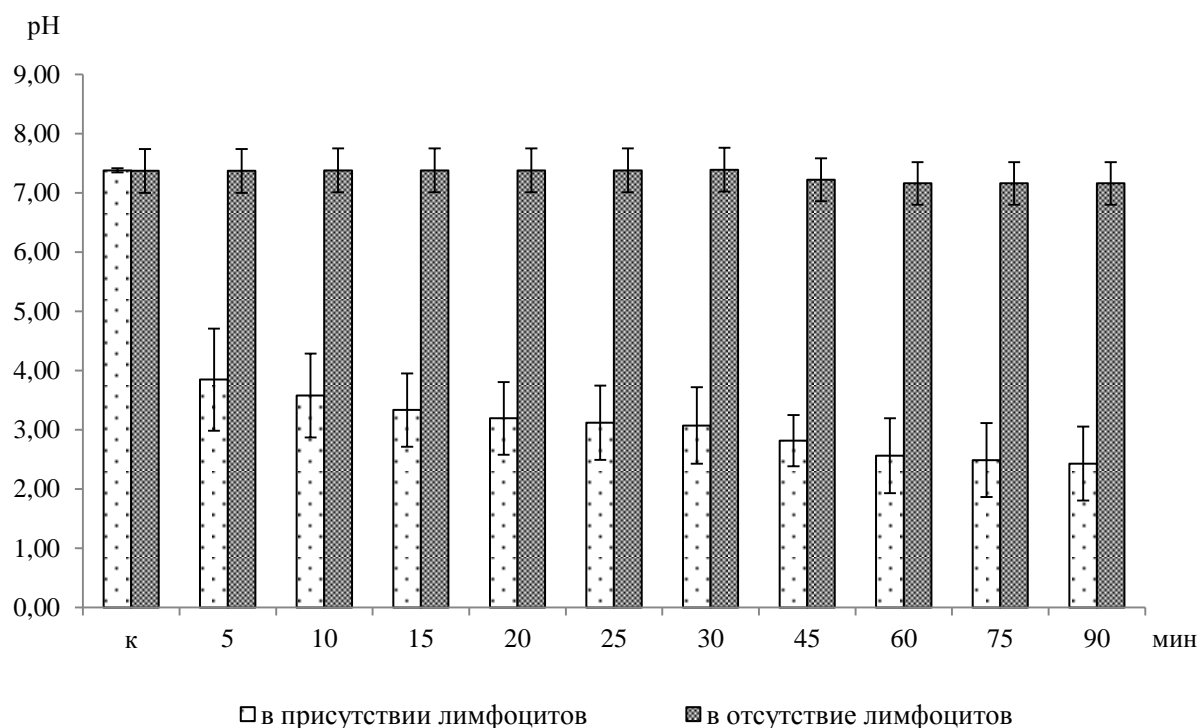
3.2. Исследование влияния монооксида углерода (5÷90 мин.) на изменение активности ионов водорода (рН) в растворе Хенкса лимфоцитов крови человека

Для осуществления множества химических процессов большое значение имеет кислотность среды, а возможность протекания биохимической реакции в биологической системе часто зависит от активности ионов водорода (рН) среды. Сдвиг значения рН играет существенную роль в изменении скорости ферментативных реакций.

Исследуя концентрацию водородных ионов в буферном растворе Хенкса (рН=7,4) без лимфоцитов крови человека, который подвергался воздействию СО в

течение 5÷90 мин., мы зарегистрировали следующее. Через 5 мин. после пропускания CO через буферный раствор величина рН составила $7,37 \pm 0,03$ ед. против 7,40, а через 90 мин. – $7,16 \pm 0,02$ ед., причем эти показатели статистически значительно отличались друг от друга (Рис. 5).

Рис. 5. Изменения активности ионов водорода (рН) в растворе Хенкса после СО-модификации в присутствии и отсутствие лимфоцитов крови человека



Величина рН суспендированных в растворе Хенкса нативных иммунокомпетентных клеток составила в среднем $7,38 \pm 0,03$ и не изменялась на протяжении 90 мин., т.е. статистически значимых изменений исследуемого показателя в данном промежутке времени не наблюдалось.

В условиях экспозиции лимфоцитов в атмосфере оксида углерода (II) было зарегистрировано снижение значения рН уже через 5 мин. инкубации до значения $3,85 \pm 0,86$, а через 90 мин. – до $2,43 \pm 0,06$ (на 47,8% и 67,1% соответственно относительно контрольного значения – $7,37 \pm 0,03$).

Известно (В.И. Коржов, А.В. Видмаченко, 2010), что оксид углерода (II) слабо растворим в воде (2,691 мг на 100 г при 23 °С и давлении 760 мм рт. ст.) и химически с ней не взаимодействует. По-видимому, в наших экспериментах ко-

личество образовавшегося СО достаточно для растворения его в буфере Хенкса и образования угольной кислоты, что, вероятно, индуцирует незначительный сдвиг величины его рН в кислую сторону ($7,16 \pm 0,02$). При суспендировании иммунокомпетентных клеток в растворе Хенкса отмечается возрастание числа ионов H^+ и, как следствие, существенное снижение его величины рН ($2,43 \pm 0,06$).

Итак, в ходе проведенных экспериментов выявлено, что СО-модифицированные лимфоциты способны изменять в кислую сторону рН среды, в которой они суспендированны, а в свою очередь подобное закисление раствора Хенкса может влиять на различные физико-химические процессы, протекающие в мембранах и других системах иммунокомпетентных клеток и изменять их метаболизм.

3.3. Исследование влияния монооксида углерода ($5 \div 90$ мин.) на уровень экспрессии CD95 рецепторов лимфоцитов крови человека методом иммуноферментного анализа

Процесс апоптоза часто начинается с активации рецепторов клеточной гибели – CD95 (Fas-) маркеров, которые экспрессированны на поверхности мембраны лимфоцитов крови человека. С целью выяснения возможности реализации Fas-зависимого пути апоптоза лимфоцитов в условиях воздействия монооксида углерода нами было исследовано изменение уровня экспрессии CD95 (Fas-) рецепторов на поверхности их мембраны.

Методом ИФА установлено, что уровень экспрессии Fas-рецепторов на поверхности мембран интактных лимфоцитов крови доноров в среднем составлял $0,350 \pm 0,073$ опт. ед. Суточная инкубация нативных лимфоцитов в термостате при $37^\circ C$ не отразилась на уровне CD95 рецепторов (Табл. 2).

Таблица 2. Уровень экспрессии CD95 рецепторов СО-модифицированных лимфоцитов крови человека до и после их суточного термостатирования

Время инкубации	Уровень экспрессии CD95 рецепторов СО-модифицированных лимфоцитов крови человека	Уровень экспрессии CD95 рецепторов СО-модифицированных лимфоцитов крови человека через 24 ч.
контроль	0,350±0,073	0,271±0,079
5 мин.	0,394±0,094	0,329±0,020
10 мин.	0,336±0,070	0,321±0,016
15 мин.	0,394±0,048	0,304±0,015
20 мин.	0,376±0,100	0,290±0,011
25 мин.	0,391±0,060	0,257±0,021
30 мин.	0,403±0,060	0,246±0,031
45 мин.	0,260±0,046	0,200±0,042*
60 мин.	0,235±0,024*	0,196±0,029*
75 мин.	0,236±0,032*	0,190±0,030*
90 мин.	0,236±0,033*	0,189±0,040*

* – отклонения исследуемого показателя от контроля статистически значимы

Инкубирование суспензии клеток в атмосфере СО при экспозиции 5÷45 мин. не приводило к статистически значимым изменениям уровня экспрессии изучаемого антигена по сравнению с контрольным образцом (Рис. 6), а инкубация в течение 60, 75 и 90 мин. (Рис. 7) сопровождалась снижением ИФА-сигнала до величин 0,235±0,024; 0,236±0,032 и 0,236±0,033 опт. ед. соответственно, т.е. количество CD95 молекул на мембранах СО-модифицированных клеток уменьшилось на 32,2%. После 24-ч. нахождения исследуемых объектов в термостате эти показатели снизились и достигли значений 0,196±0,029; 0,190±0,030; 0,189±0,040 опт. ед., что составило в среднем 44-46 % от величины интактного контроля.

Рис. 6. Уровень экспрессии CD95 рецепторов нативными и СО-модифицированными (5÷45 мин.) лимфоцитами до и после их суточного термостатирования

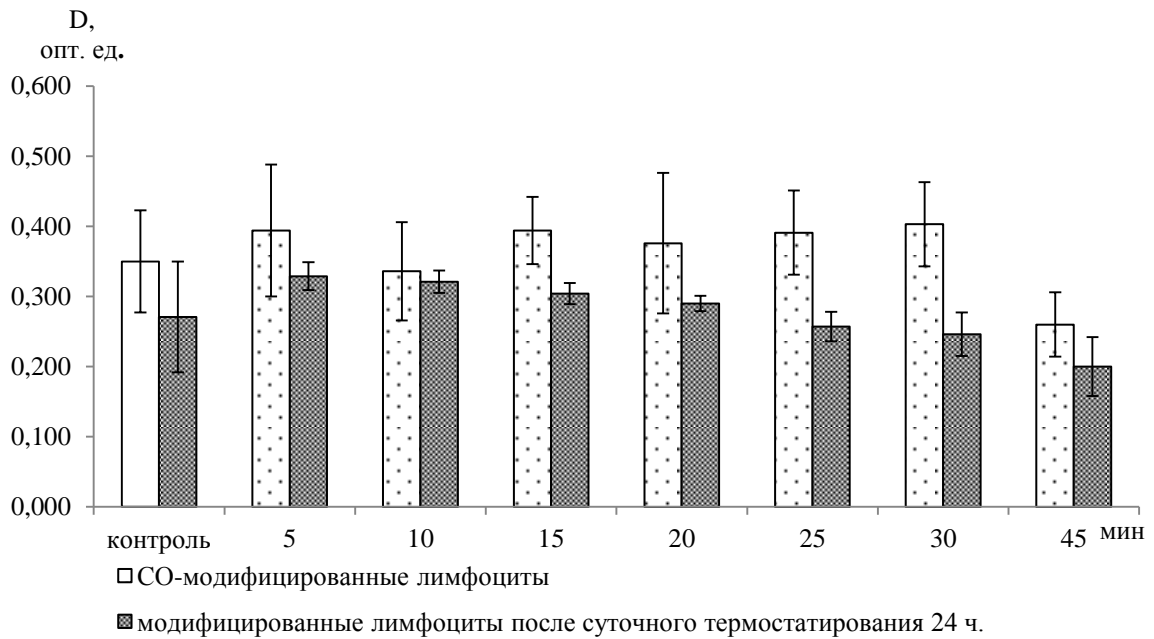
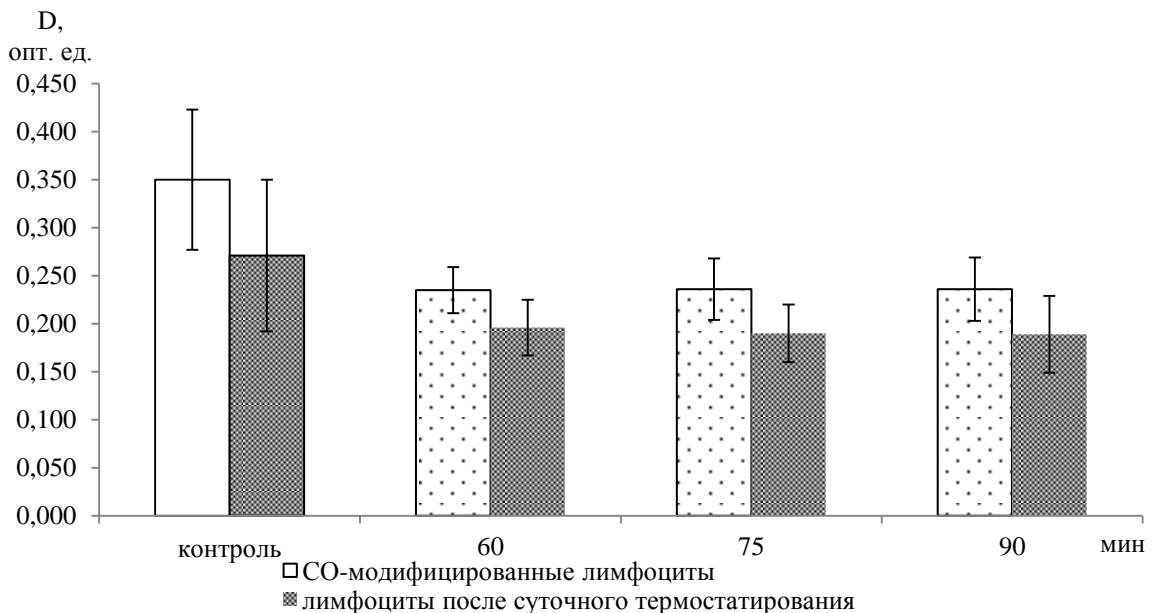


Рис. 7. Уровень экспрессии CD95 рецепторов нативными и СО-модифицированными (60÷90 мин.) лимфоцитами до и после их суточного термостатирования



Таким образом, для дальнейших исследований молекулярных механизмов влияния монооксида углерода на программируемую клеточную смерть было выбрано время инкубации в атмосфере изучаемого газа в течение 60, 75 и 90 мин.

Применение указанного интервала времени характеризуется наибольшими изменениями тестируемых показателей.

Понижение уровня экспрессии CD95 антигенов после воздействия оксида углерода (II) может быть обусловлено гибелью части популяции лимфоцитов. Однако в наших экспериментах по изучению воздействия монооксида углерода на уровень жизнеспособности лимфоцитов крови человека было выявлено, что доля погибших клеток после 90 мин. инкубации в атмосфере оксида углерода (II) составила 12,3%; а после их суточного термостатирования – 16,0%. В то же время снижение уровня экспрессии CD95 антигенов на поверхности лимфоцитов, подвергшихся воздействию CO в течение 90 мин. и суточному термостатированию, было более значительным и составило 30,3% (относительно контрольных образцов после 24 ч. инкубации в термостате) и 46,0% (относительно нативного контроля). Последнее говорит о том, что после инкубации образцов иммуноцитов в атмосфере CO, возможно, могут возникать и иные процессы, способствующие падению экспрессии CD95 маркеров на поверхности мембран клеток. Они могут быть обусловлены интернализацией маркеров в более глубокие слои мембраны лимфоцитов, шеддингом рецепторов с внешних примембранных слоев гликокаликса клеток, изменением конформации молекул CD95 в результате прямого или опосредованного действия оксида углерода (II), с возможным блокированием синтеза исследуемых маркеров.

3.3.1. Изучение влияния блокаторов синтеза белка на уровень экспрессии CD95 рецептора CO-модифицированных лимфоцитов крови человека

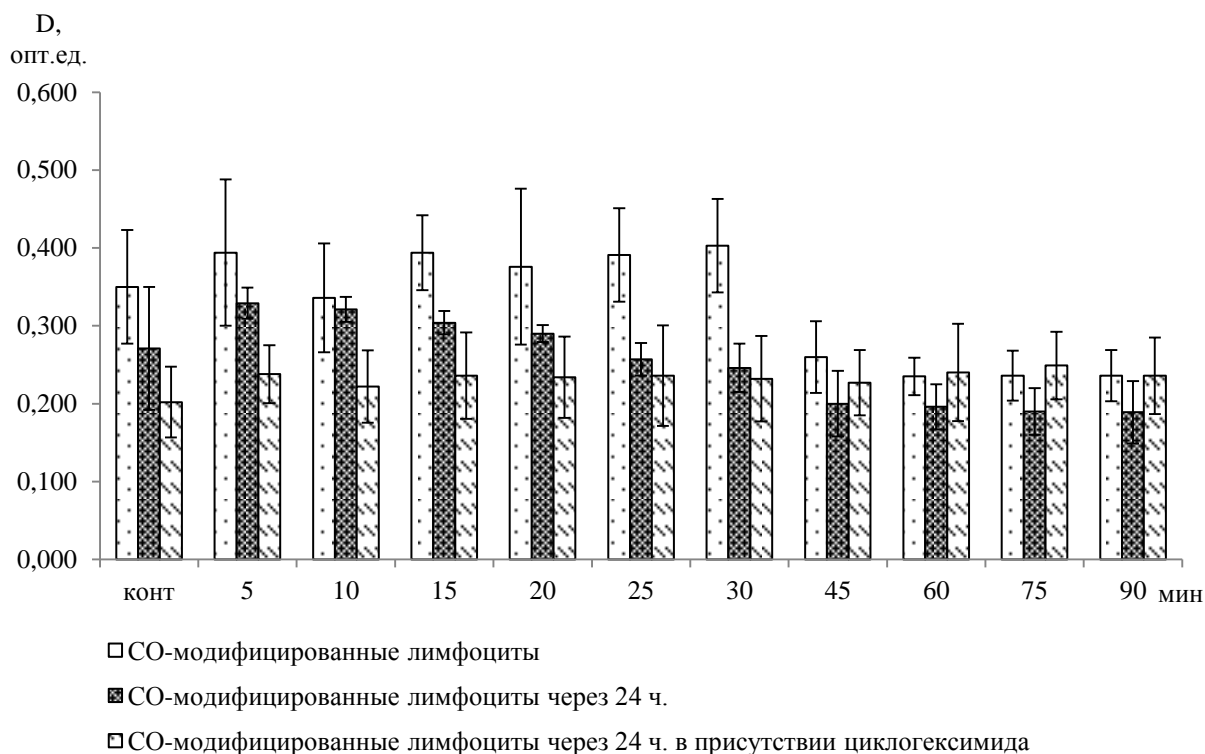
Для выяснения причин снижения уровня экспрессии CD95 рецептора после воздействия оксида углерода (II) нами был проанализирован уровень экспрессии CD95 маркера после 24-ч. инкубации их в термостате (37 °C) в присутствии циклогексимида и анизомицина – блокаторов синтеза белка эукариот.

Внесение циклогексимида в суспензию лимфоцитов и их 24-ч. инкубация в термостате при 37 °C способствовали снижению ИФА-сигнала до $0,202 \pm 0,005$

опт.ед. (на 42,3%) Это свидетельствует о том, что нативные лимфоциты продолжают синтезировать CD95 молекулы de novo в течение суток после выделения из крови.

Циклогексимид не оказывал влияния на уровень экспрессии CD95 рецепторов лимфоцитами, длительное время инкубированных в атмосфере CO (45÷90 мин.), хотя при меньших экспозициях в атмосфере монооксида углерода (5÷30 мин.) наблюдалось угнетение синтеза анализируемых молекул иммунокомпетентными клетками (Рис. 8).

Рис. 8. Уровень экспрессии CD95 рецепторов нативными и CO-модифицированными (5÷90 мин.) лимфоцитами до и после их суточного термостатирования в отсутствие и в присутствии циклогексимид

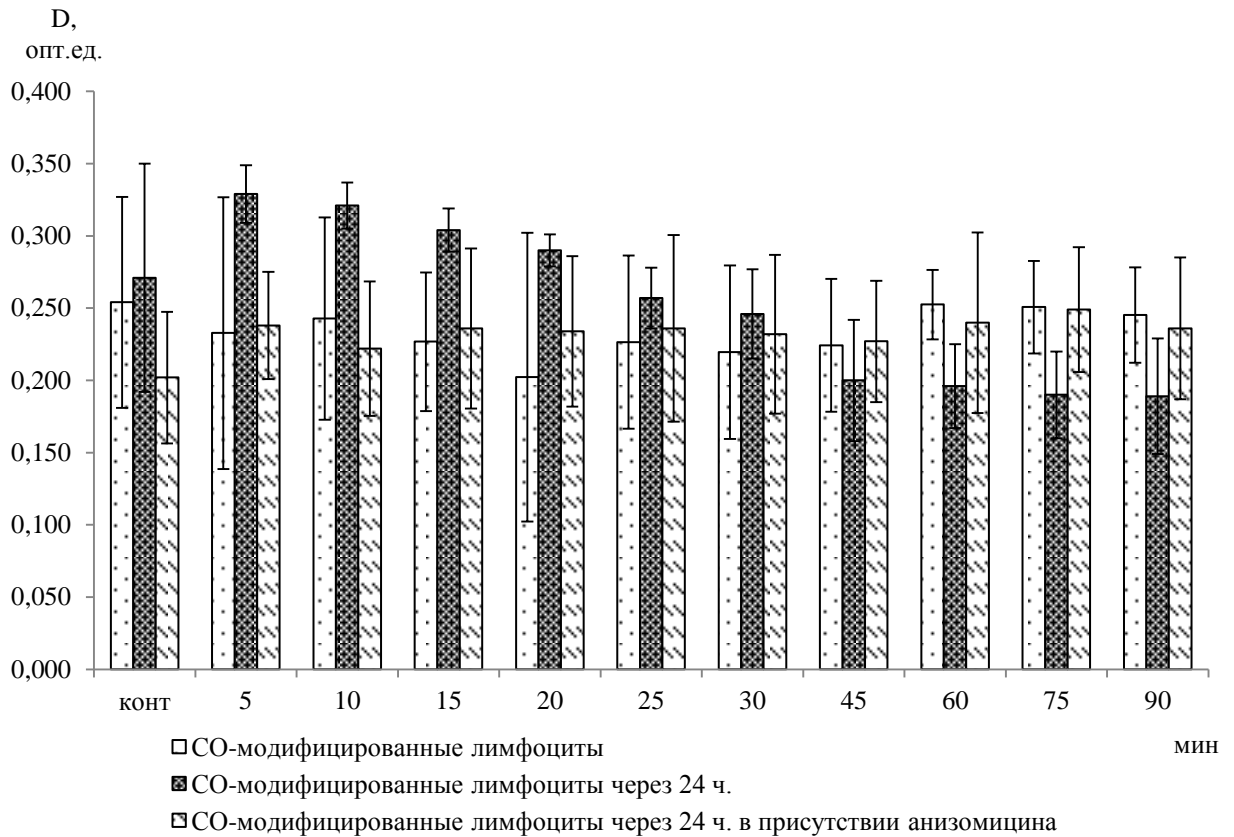


При внесении анизомидина в суспензию лимфоцитов и их 24-ч. инкубации в термостате при 37 °С не происходило статистически значимых изменений уровня экспрессии CD95 рецепторов относительно контроля.

Уровень экспрессии CD95 рецепторов на поверхности лимфоцитов, инкубированных в атмосфере монооксида углерода в течение 5, 10, 15, 20 мин., после 24-ч. нахождения в термостате в присутствии анизомидина статистически значи-

мо снизился по сравнению с соответствующими СО-модифицированными образцами без анизомицина на 29,2%; 24,3%; 25,3% и 30,3% (Рис. 9).

Рис. 9. Уровень экспрессии CD95 рецепторов нативными и СО-модифицированными (5÷90 мин.) лимфоцитами до и после их суточного термостатирования в отсутствие и в присутствии анизомицина



Это может свидетельствовать о том, что иммунокомпетентные клетки, подвергшиеся воздействию оксида углерода (II) (5÷20 мин), продолжают синтезировать CD95 молекулы *de novo* в течение суток после выделения из гепаринизированной крови доноров.

Более длительное пребывание иммунокомпетентных клеток в атмосфере СО (25÷90 мин) в присутствии блокатора синтеза белка анизомицина не оказывало влияния на уровень экспрессии CD95 рецепторов относительно контрольных значений.

3.4. Исследование влияния монооксида углерода (60, 75 и 90 мин.) на уровень экспрессии CD95 рецепторов лимфоцитов крови человека методом проточной цитофлуориметрии

С целью выяснения возможности реализации Fas-зависимого пути апоптоза лимфоцитов в условиях воздействия монооксида углерода нами было исследовано изменение выраженности экспрессии CD95 (Fas-) рецепторов.

Цитометрические исследования суспензий интактных лимфоцитов показали, что содержание CD95⁺-клеток составляло 36,0±3,1%, а их средняя интенсивность флуоресценции (СИФ) – 3,0±0,2 усл. ед. Количество CD95⁺ клеток согласуется с данными М. Massaia (1995).

После воздействия на смесь иммуноцитов монооксида углерода в течение 60, 75 и 90 мин. СИФ клеток понижалась соответственно на 13,6; 25,2 и 27,5% (Рис. 10, 11).

Рис. 10. Величины средней интенсивности флуоресценции CD95 маркеров на поверхности лимфоцитов крови человека, модифицированных монооксидом углерода (60, 75 и 90 мин.)

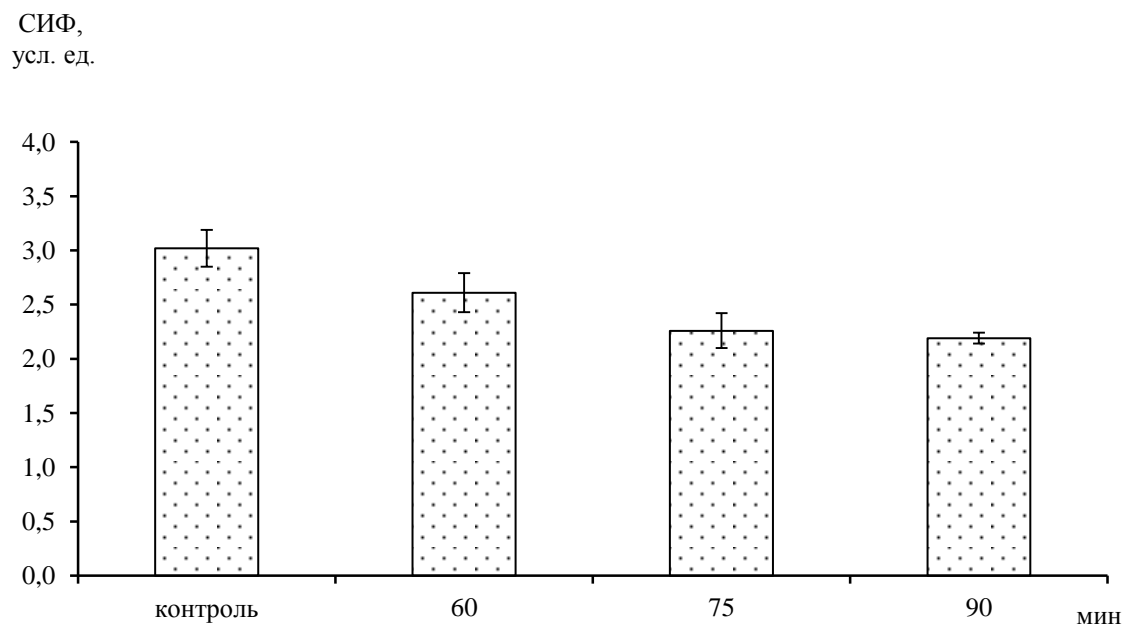
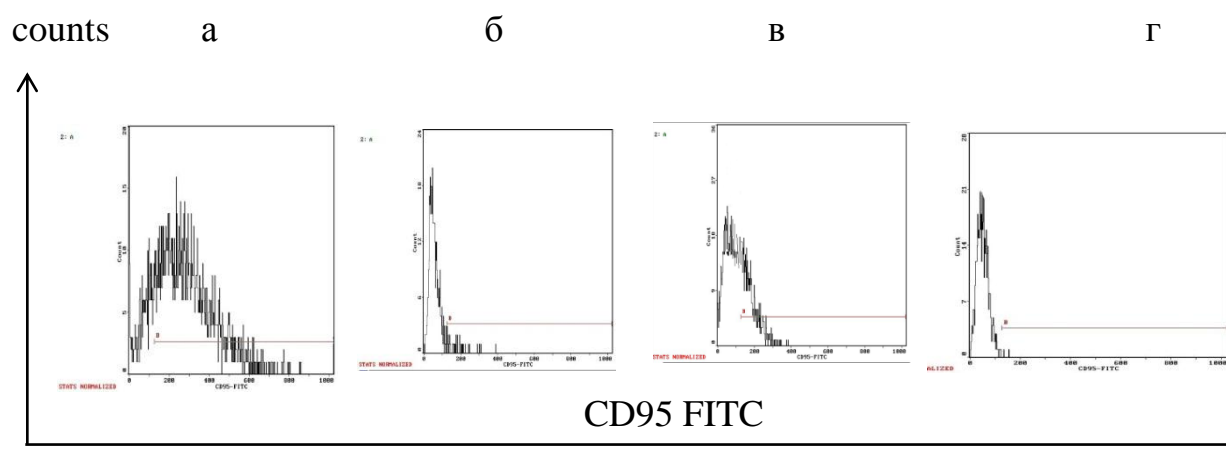


Рис. 11. Однопараметрические гистрограммы изменения уровня экспрессии CD95-маркеров на поверхности лимфоцитов крови человека, модифицированных монооксидом углерода (специфическое окрашивание клеток, с которыми связывается значительное количество FITC-меченных антител к CD95), а – контрольные образцы; б, в, г – СО-модифицированные лимфоциты соответственно 60, 75 и 90 мин.



Полученные результаты подтверждают тестируемые нами с помощью метода ИФА изменения в исследуемой системе. Наблюдаемое падение экспрессии CD95 маркеров на поверхности лимфоцитов после инкубации в атмосфере СО может свидетельствовать о нарушении Fas-опосредованного пути развития апоптоза и служить предпосылкой к развитию гипотезы об антиапоптотическом потенциале монооксида углерода.

Представленные нами данные согласуются с исследованиями, проведенными ранее на других типах животных клеток. Так, добавление в клеточные культуры экзогенного СО препятствовало TNF (Fas/CD95)-индуцированному апоптозу мышинных фибробластов, эндотелиальных клеток, β -клеток поджелудочной железы. Выявлено, что ингибирующее воздействие монооксида углерода на TNF-индуцированный апоптоз эндотелиальных клеток может быть отменено при действии на клетки селективного ингибитора MAP-киназы p38 (P. Inguaggiato, L. Gonzales-Michaca, 2001). Показано (Н.В. Рязанцева, В.В. Новицкий, 2009), что p38 обладает проапоптотическими свойствами, которые реализуются за счет фосфорилирования транскрипционного фактора p53. R. Song et al. (2004) продемонстрировали, что для ингибирования митохондриального пути реализации апоптоза,

СО способен активировать MAP-киназу p38 и приводить к фосфорилированию ERK MAP-киназ, удлиняющих рецепторный апоптотический путь. В проведенных экспериментах с использованием монооксида углерода было показано, СО может обладать антиапоптотическими свойствами за счет индукции Nf-kB-зависимых генов, препятствующих деполяризации митохондрий (B.S. Zuckerbraun, T.R. Billiar, 2003;).

3.5. Исследование влияния монооксида углерода (5÷90 мин.) на уровень экспрессии CD8 рецепторов лимфоцитов крови человека методом иммуноферментного анализа до и после их суточного термостатирования

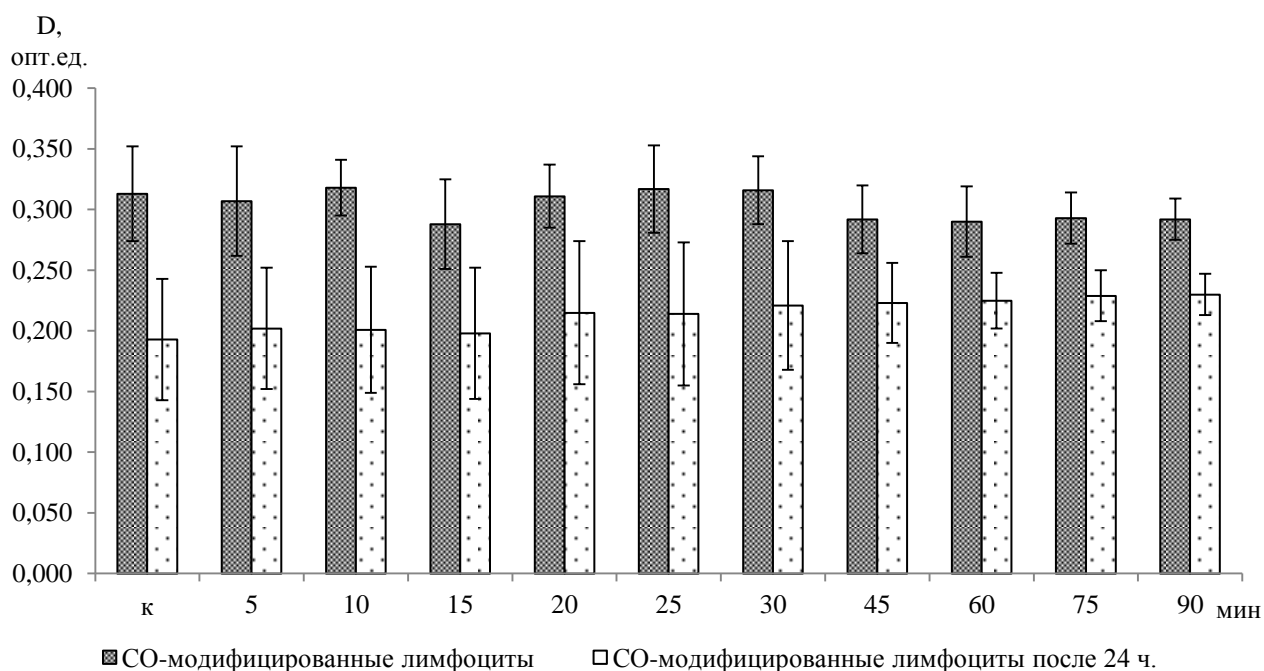
Индукция апоптоза может наблюдаться во время атаки поврежденных клеток цитотоксическими Т-лимфоцитами, которые, помимо активации Fas-рецептора, могут секретировать перфорин вблизи мембраны поврежденной клетки. Перфорин, полимеризуясь, формирует трансмембранные каналы, через которые внутрь клетки проникают гранзимы, которые в свою очередь способствуют активации каспазы-3. В результате вышеописанных событий запускается каспазный каскад. В связи с изложенным выше, нами были проведены серии экспериментов по исследованию воздействия монооксида углерода на уровень экспрессии CD8 рецепторов лимфоцитами крови человека.

По уровню экспрессии и характеру ответа CD8 антигенов на модификацию лимфоцитов оксидом углерода (II) доноры были разделены на две группы.

Уровень экспрессии CD8 молекул на поверхности мембран интактных клеток I группы доноров составил в среднем $0,313 \pm 0,041$ опт. ед. Инкубирование суспензии клеток в атмосфере СО (5÷90 мин.) не привело к статистически значимым изменениям ИФА-показателя по сравнению с контрольным образцом, то есть количество CD8 молекул на мембранах клеток, модифицированных СО в течение исследуемого диапазона времени, не изменилось.

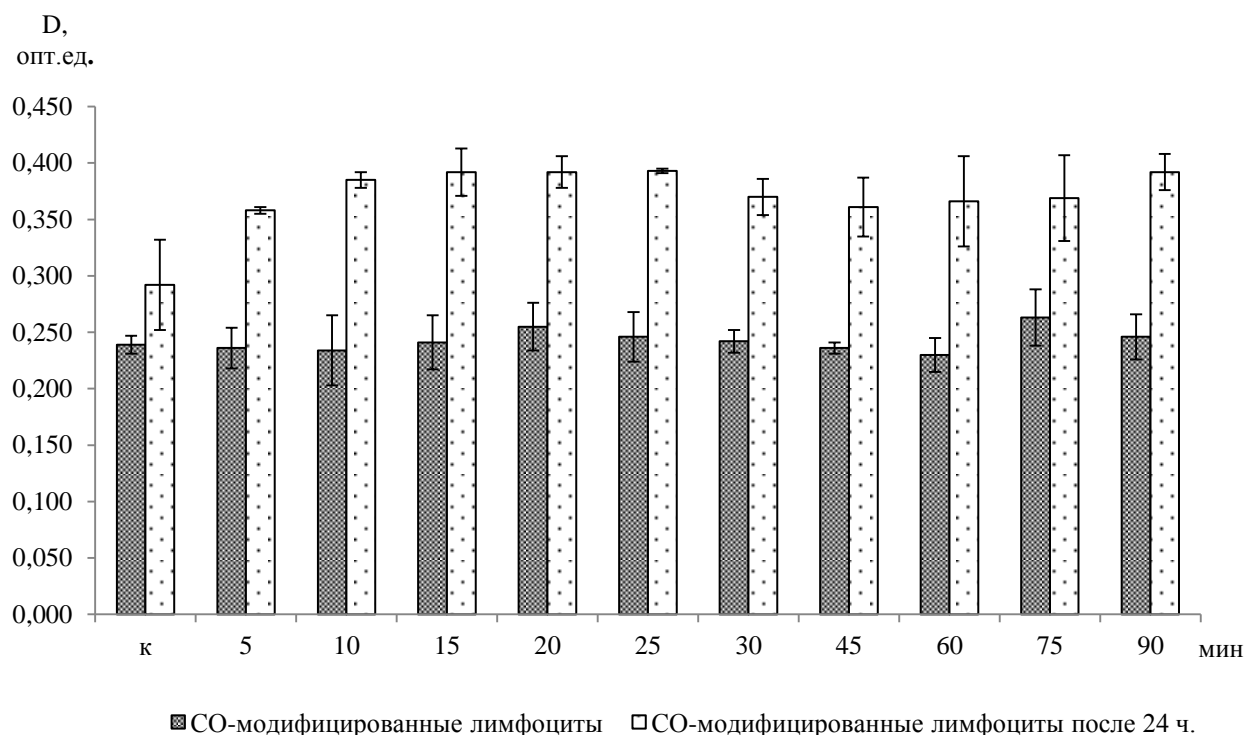
После суточного нахождения нативных объектов в термостате мы зарегистрировали статистически значимое снижение уровня экспрессии CD8 молекул до значения $0,183 \pm 0,029$ опт. ед. (на 41,5% по сравнению с интактными клетками). У лимфоцитов, СО-модифицированных в течение 5÷90 мин., и подвергшихся суточному инкубированию в термостате, так же наблюдалось уменьшение количества CD8 маркеров на поверхности мембран лимфоцитов на 16-42% (Рис. 12).

Рис. 12. Уровень экспрессии CD8 рецепторов СО-модифицированных лимфоцитов крови I группы доноров



Во II группу вошли доноры, у которых уровень экспрессии CD8 молекул нативных лимфоцитов был изначально меньше, чем у лиц I группы и в среднем составлял $0,239 \pm 0,010$ опт. ед. После инкубирования лимфоцитов в атмосфере оксида углерода (II) в течение 5÷90 мин., так же как и у I группы доноров, не происходило статистически значимых изменений количества CD8 антигенов на поверхности мембран лимфоцитов относительно контрольных образцов. Суточная инкубация интактных клеток этой группы доноров в термостате при 37°C приводила к статистически значимому увеличению уровня экспрессии CD8 маркеров лимфоцитарных клеток ($0,292 \pm 0,040$ опт. ед.). 24-ч. нахождение исследуемых СО-модифицированных клеток в термостате индуцировало рост экспрессии исследуемых молекул на 28-64% (Рис. 13).

Рис. 13. Уровень экспрессии CD8 рецепторов СО-модифицированных лимфоцитов крови II группы доноров



В ходе проведенных нами исследований было показано иммуномодулирующее действие оксида углерода (II) после 24 ч. нахождения СО-модифицированных лимфоцитов в термостате на экспрессию CD8 молекул на поверхности мембран лимфоцитов. Это выразалось в зависимости между исходным уровнем CD8 маркеров и ответной реакцией его молекул на воздействие монооксида углерода: тестируемый показатель снижался после суточного термостатирования модифицированных лимфоцитов у доноров с исходно высокими (I группа) и возрастал у лиц с исходно низкими (II группа) его значениями.

Разнонаправленная ответная реакция иммуноцитов крови человека на воздействие оксида углерода (II), вероятно, обусловлена различной СО-чувствительностью CD8 рецепторов разных групп лиц.

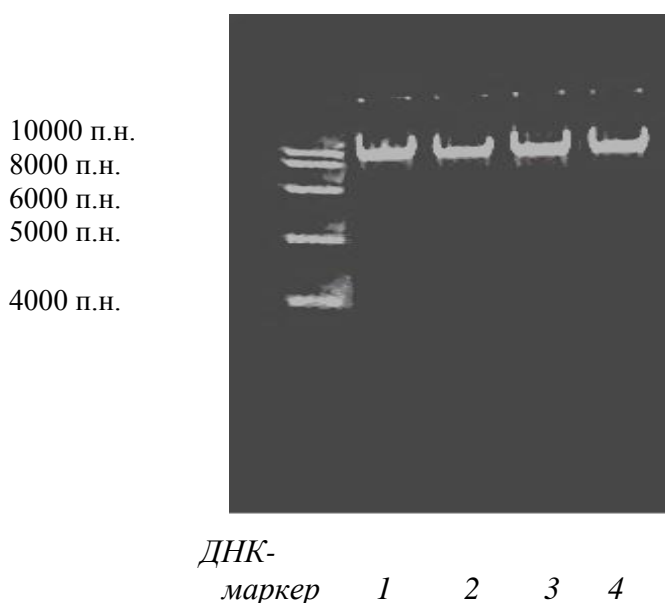
Таким образом, нами установлено, что оксид углерода (II) существенно модулирует состояние CD8 антигенов мембран лимфоцитов, вызывая неодинаковые по направленности и глубине изменения уровня экспрессии изучаемой молекулы межклеточной адгезии.

3.6. Исследование структурного состояния молекул ДНК лимфоцитов крови человека после воздействия монооксида углерода (60,75 и 90 мин.) до и после их суточного термостатирования

В связи с тем, что фрагментация молекулы геномной ДНК является главным признаком апоптотической гибели клеток, мы исследовали структурное состояние ДНК лимфоцитов методом электрофореза в агарозном геле.

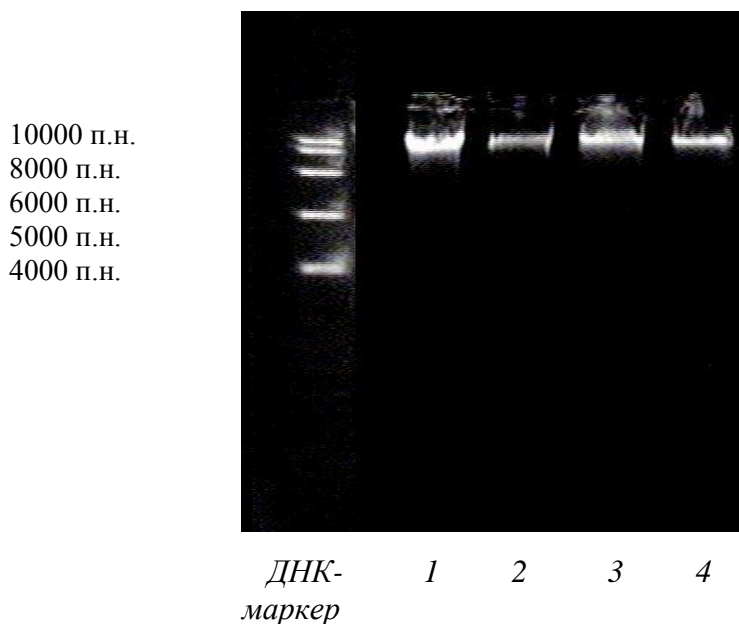
Анализ данных, представленных на рис. 14, показал, что на электрофоретической дорожке 1 (контроль), выявляется одна полоса, соответствующая высокомолекулярной ДНК нативных клеток. При экспозиции лимфоцитов крови человека *in vitro* в атмосфере монооксида углерода (60, 75 и 90 мин.) фракция ДНК также представлена полосой с молекулярной массой 10000 п.н., что характерно для ее интактной формы. Электрофоретическая подвижность (ЭФП) макромолекул изучаемых образцов составила 1,30 см.

Рис. 14. Электрофореграмма ДНК лимфоцитов до (1) и после воздействия монооксида углерода в течение 60 (2), 75 (3) и 90 мин. (4)



Через 24 ч. после нахождения СО-модифицированных образцов (60, 75, 90 мин.) в термостате (5% CO₂ и 95% относительной влажности) на электрофореграмме (Рис. 15) были обнаружены фрагменты высокомолекулярной ДНК, также соответствующей размерам 10000 п.н.

Рис. 15. Электрофореграмма ДНК лимфоцитов до (1) и после воздействия монооксида углерода в течение 60 (2), 75 (3) и 90 мин. (4) после суточного термостатирования



Следовательно, инкубация лимфоцитов крови человека в атмосфере оксида углерода (II) в течение 60, 75 и 90 мин. не вызывает фрагментации молекулы ДНК, что доказывает отсутствие развития программируемой клеточной гибели лимфоидных клеток в исследуемых условиях.

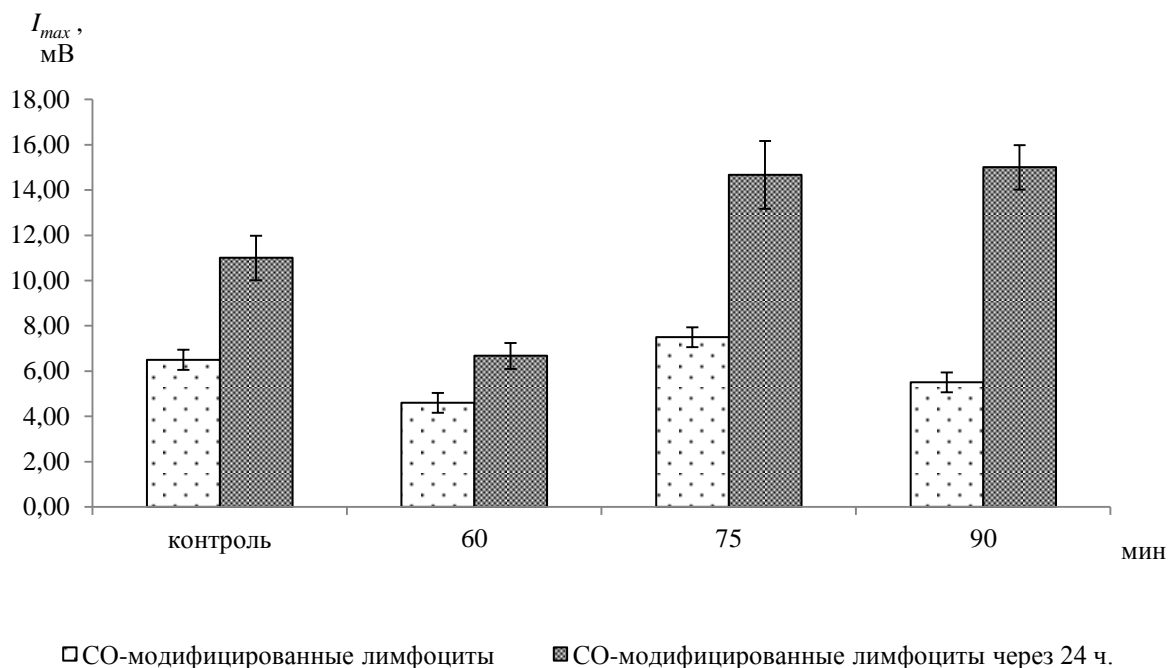
3.7. Исследование люминолзависимой биохемилюминесценции лимфоцитов крови человека после воздействия монооксида углерода (60, 75 и 90 мин.) до и после их суточного термостатирования

Показано (В.Г. Артюхов, М.С. Трубицына и др., 2011), что протекание процессов программируемой клеточной гибели, как правило, сопровождается генерацией значительных количеств активных форм кислорода (АФК).

Параметр I_{max} нативных лимфоцитов составил $6,5 \pm 0,4$ мВ. После СО-воздействия на суспензию лимфоцитов в течение 60 мин. происходило понижение уровня I_{max} на 41,3%, а через 75 мин. инкубации исследуемый параметр увеличивался на 15,4% (по отношению к контролю). Экспозиция иммунокомпетентных клеток в атмосфере оксида углерода (II) в течение 90 мин.

приводила к уменьшению интенсивности хемилюминесценции на 15,3% по сравнению с контрольным значением (Рис. 16).

Рис. 16. Величины максимальной интенсивности хемилюминесценции (I_{max}) СО-модифицированных лимфоцитов до и после суточного термостатирования



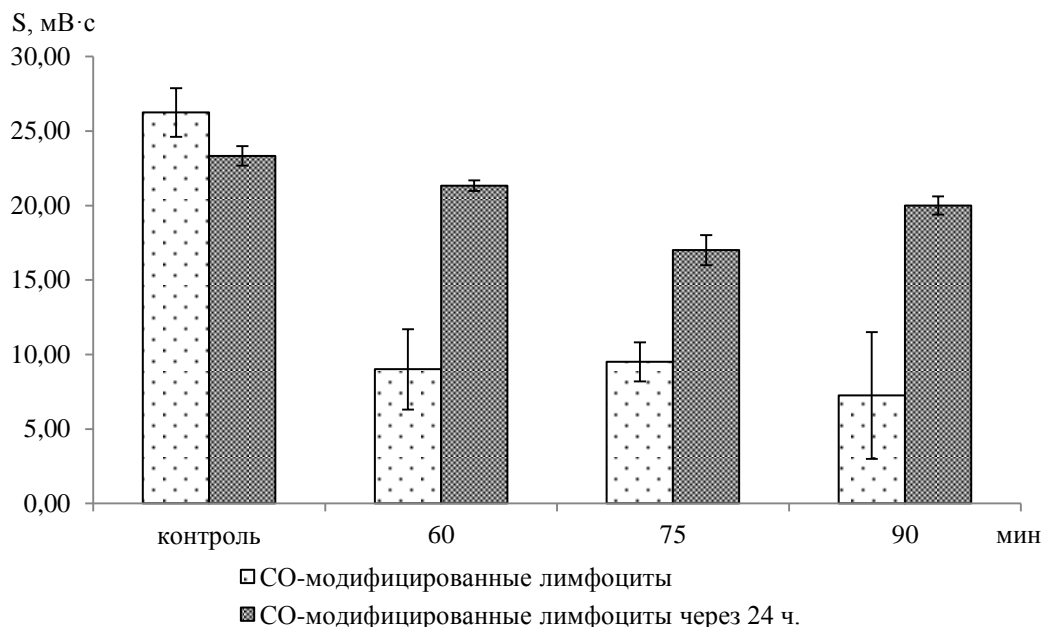
Через 24 ч. параметр I_{max} нативных иммунокомпетентных клеток возрастал по отношению к контролю на 69,2%. У СО-модифицированных лимфоидных клеток (60, 75 и 90 мин.) после суточного термостатирования интенсивность биохемилюминесценции увеличивалась на 45,0%, 95,6% и 172,7% соответственно относительно таких же образцов, не подвергшихся 24 ч. инкубации в термостате.

Светосумма хемилюминесценции контрольных образцов составила $26,3 \pm 1,6$ мВ·с. После выдерживания лимфоцитов крови человека в атмосфере СО в течение 60÷90 мин. наблюдалось статистически значимое понижение изучаемого показателя соответственно на 65,7; 63,8% и 72,4% (Рис. 17).

Суточная инкубация нативных иммуноцитов в термостате индуцировала статистически значимое снижение светосуммы на 11,3% до значения $23,33 \pm 0,65$ мВ·с (относительно контроля). Инкубирование в течение 24 ч. СО-модифицированных клеток (60, 75 и 90 мин.) приводило к статистически

значимому повышению определяемого показателя на 137,0%, 78,9% и 173,9% соответственно относительно таких же образцов без суточного хранения.

Рис. 17. Величины светосуммы (S) хемилюминесценции СО-модифицированных лимфоцитов до и после суточного термостатирования



Таким образом, нами выявлено снижение параметров биохемилюминесценции после инкубации в атмосфере СО (60 и 90 мин.), что указывает на уменьшение интенсивности протекания процессов ПОЛ и образования АФК в клетках, а, следовательно, снижается вероятность развития апоптоза. Однако через 24 ч. инкубации СО-модифицированных лимфоцитов наблюдалось увеличение интенсивности свободнорадикальных процессов. В исследованиях S.R. Thom (1990), СО-зависимое пероксидное окисление липидов приводило к ингибированию супероксиддисмутазы и соединений железа. Кроме того, внутриклеточная продукция H_2O_2 в мозге увеличивалась при повышении концентрации СО, что сопровождалось также повышением гидроксильного радикала липидов (D. Lautier, P. Luscher et al., 1992; С.А. Piantadosi, L. Tatro et al, 1995). В других исследованиях *in vitro* показано, что СО понижал продукцию провоспалительных цитокинов ($TNF-\alpha$, ИЛ- 1β) и стимулировал продукцию противовоспалительного медиатора ИЛ-10 (L.E. Otterbein, F.H. Bach, 2000). Регуляция генерирования свободных радикалов является одним

из главных механизмов действия монооксида углерода. Это может осуществляться фосфорилированием Akt, активацией Nf-kb, p38-MAPK и др. (Ashley A. Untereiner, 2012). Возможно, в связи с вышеуказанными причинами, можно предположить наличие специфического механизма генерации АФК при действии оксида углерода (II) *in vivo*, играющего определенную роль в трансдукции сигналов к клеточной смерти, репарации и пролиферации (С.А. Piantodosi, 2002).

3.8. Исследование активности митохондриальной сукцинатдегидрогеназы лимфоцитов крови человека после воздействия монооксида углерода (60, 75 и 90 мин.) до и после их суточного термостатирования

Каталитическая активность сукцинатдегидрогеназы (СДГ) в митохондриальной фракции нативных лимфоцитов крови человека составила $7,2 \pm 0,8$ мкмоль/л·мин. Через 75 мин. воздействия СО на иммунциты наблюдается статистически значимое возрастание анализируемого показателя на 33,3% до значения $9,6 \pm 0,5$ мкмоль/л·мин относительно контроля. После экспозиции лимфоидных клеток с монооксидом углерода в течение 60 и 90 мин. активность митохондриальной СДГ не изменялась (Табл. 3).

Таблица 3. Ферментативная активность митохондриальной сукцинатдегидрогеназы СО-модифицированных лимфоцитов до и после их суточного термостатирования

Условия опыта	Ферментативная активность СДГ, мкмоль/л·мин	Ферментативная активность СДГ через 24 ч., мкмоль/л·мин
Контроль	$7,2 \pm 0,8$	$6,6 \pm 1,4$
60 мин.	$5,9 \pm 0,5$	$9,5 \pm 1,4^{* **}$
75 мин.	$9,6 \pm 0,5^{*}$	$6,8 \pm 1,7^{**}$
90 мин.	$7,6 \pm 0,7$	$5,7 \pm 1,8$

*отклонения исследуемого показателя от контроля статистически значимы;

**отклонения исследуемого показателя от измерений после инкубации в атмосфере монооксида углерода статистически значимы.

Суточная инкубация лимфоцитов при 37 °С не приводила к статистически значимым изменениям каталитической активности СДГ лимфоцитов крови человека. У объектов, модифицированных СО в течение 60 мин., и дальнейшего нахождения в термостате 24 ч., выявлено статистически значимое увеличение активности СДГ на 31,9% по сравнению с контролем и на 61,0% по сравнению с соответствующими образцами без термостатирования. После 24 ч. инкубации иммунокомпетентных клеток, СО-модифицированных воздействием монооксида углерода в течение 75 мин., наблюдалось статистически значимое снижение активности изучаемого фермента на 29,2% соответственно относительно таких же образцов, не подвергшихся суточному инкубированию в питательной среде. Уменьшение активности фермента СДГ в митохондриальной фракции суспензии СО-модифицированных клеток после ее повышения возможно обусловлено нарушением конформации активного центра фермента, что сказывается в свою очередь на уменьшении его ферментативной активности. СДГ, являясь по своей структуре железосерофлавопротеином, содержит в составе Fe-S-кластеры и сульфгидрильные группы. Вероятно, взаимодействие СО с SH-группами или повреждение Fe-S-центров белка может приводить к конформационным изменениям фермента. Известно, что у монооксида углерода – высокое сродство к ионам железа.

Повышение внутриклеточной концентрации монооксида углерода влияет на жизнедеятельность митохондрий и имеет существенное значение как при физиологических, так и патологических состояниях. В работах A. Sandouka et al. (2006) показано, что СО способен улучшать респираторный индекс изолированных митохондрий и снижать развитие окислительного стресса.

3.9. Исследование активности цитохром *c* оксидазы митохондрий лимфоцитов крови человека после воздействия монооксида углерода (60, 75 и 90 мин.) до и после их суточного термостатирования

Воздействие монооксида углерода в течение 60, 75 и 90 мин. на лимфоциты крови человека не приводило к статистически значимому изменению активности ЦО относительно величины интактного контроля (Табл. 4).

Таблица 4. Ферментативная активность митохондриальной цитохром *c* оксидазы СО-модифицированных лимфоцитов до и после их суточного термостатирования

Условия опыта	Ферментативная активность ЦО, мкмоль/л·мин	Ферментативная активность ЦО через 24 ч. инкубации, мкмоль/л·мин
Контроль	1,4±0,3	1,0±0,2
60 мин.	1,4±0,1	1,4±0,3
75 мин.	1,5±0,2	1,8±0,2
90 мин.	1,6±0,1	1,9±0,1* **

*отклонения исследуемого показателя от контроля статистически значимы;

**отклонения исследуемого показателя от измерений после инкубации в атмосфере монооксида углерода статистически значимы.

Суточная инкубация нативных иммунокомпетентных клеток при 37 °С в термостате не индуцировала изменений каталитической активности ЦО митохондрий по сравнению с интактными образцами. В процессе сохранения иммуноцитов в питательной среде RPMI-1640 в течение суток выявлено увеличение активности митохондриальной ЦО на 35,7% у СО-модифицированных в течение 90 мин. образцов относительно контроля и на 18,8% по сравнению с образцами без суточной инкубации.

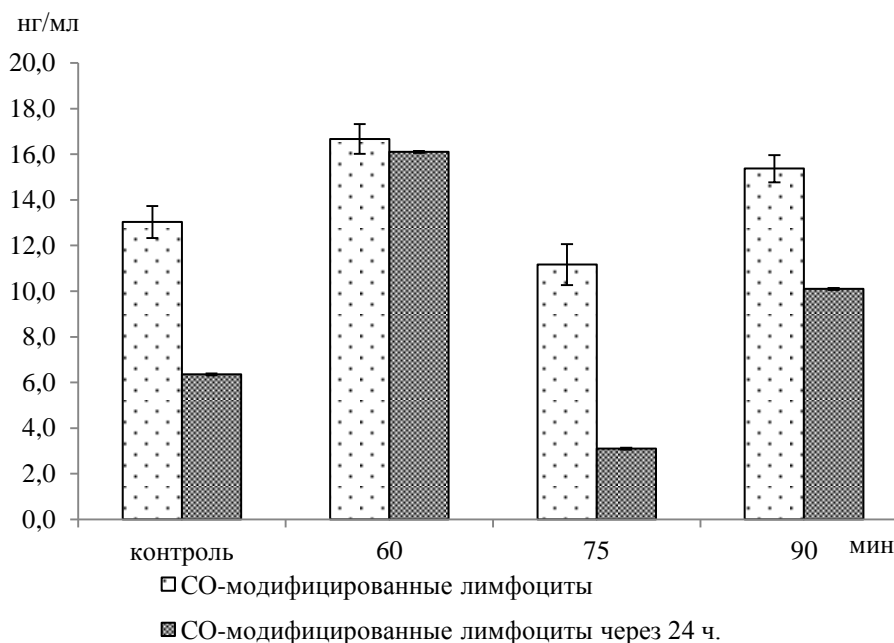
Повышение уровня СО в клетке сопровождается активацией растворимой гуанилатциклазы и увеличением образования из ГТФ цГМФ, активацией цГМФ-зависимой протеинкиназы G и фосфорилированием ее белковых субстратов, модулирующих активность калиевых и кальциевых каналов, приводя к уменьшению

внутриклеточной концентрации кальция. При этом меняется не только активность, но и регуляторные и каталитические свойства ферментных систем (В.И. Коржов, 2010).

3.10. Исследование содержания антиапоптозного белка Bcl-2 в лизате лимфоцитов крови человека после воздействия монооксида углерода (60, 75 и 90 мин.) до и после их суточного термостатирования

Концентрация белка Bcl-2 в нативных лимфоцитах составила $13,0 \pm 1,8$ нг/мл. После воздействия на смесь иммуноцитов монооксида углерода в течение 60 и 90 мин. наблюдалось статистически значимое повышение анализируемого параметра до значений $16,7 \pm 0,7$ нг/мл и $15,4 \pm 2,6$ нг/мл (на 28,5% и 18,5% относительно контрольных образцов). Экспозиция лимфоцитов в течение 75 мин. в атмосфере оксида углерода (II) индуцировала понижение концентрации протеина Bcl-2 на 13,8% до 11,2 нг/мл (Рис. 18).

Рис. 18. Содержание белка Bcl-2 в лизатах СО-модифицированных лимфоцитов (60, 75 и 90 мин.) до и после суточного термостатирования образцов



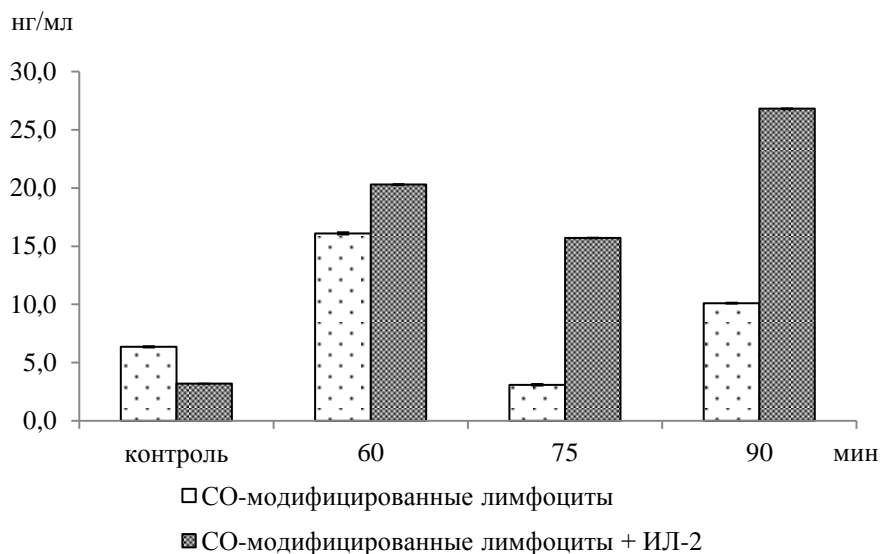
Повышение содержания белка Bcl-2 в лизатах иммуноцитов через 60 мин. после воздействия оксида углерода (II) может быть связано с активацией факторов транскрипции и последующей экспрессии белка *de novo*. Наблюдавшееся уменьшение уровня исследуемого показателя через 75 мин. после экспозиции лимфоидных клеток в атмосфере CO, возможно, связано с инактивацией ERK 1/2 MAP-киназ, фосфорилирующих Bcl-2. Известно, что стабилизация структуры Bcl-2 достигается путем его фосфорилирования в положении -56, -74 и -87 ERK 1/2. Отщепление фосфатной группы в этих регионах ведет к присоединению убиквитина и деградации Bcl-2. Возрастание величин оптической плотности данного белка (90 мин.) после его уменьшения в лизате лимфоцитов крови человека может быть связано с опосредованным влиянием монооксида углерода на факторы транскрипции исследуемого белка. Возможно, этот эффект вызван включающимся компенсаторным механизмом, посредством которого в ответ на угнетение транскрипции гена Bcl-2 происходит замедление деградации соответствующего протеина.

Экспрессия антиапоптозного белка Bcl-2 у контрольных образцов через 24 ч. инкубации в термостате статистически значимо уменьшалась на 51,2% и составила 6,35 нг/мл. У объектов, модифицированных с CO в течение 75 и 90 мин. и дальнейшей суточной инкубации происходило статистически значимое снижение анализируемого показателя на 72,3% и 34,4% соответственно относительно таких же образцов, не подвергшихся суточному термостатированию. Известно (О.В. Земченкова, 2012), что в ходе суточной инкубации нативных лимфоцитов, инкубированных в термостате в среде RPMI-1640, доля апоптотических клеток увеличивается до 9,2%, т.к. в ней отсутствуют факторы роста. Снижение активности белка Bcl-2 после 24 ч. инкубации может быть связано с вышеуказанными причинами. Полученные результаты позволяют предположить, что Bcl-2 принадлежит вспомогательная роль в регуляции митохондриальной проницаемости при действии монооксида углерода на лимфоциты крови человека.

3.11. Исследование содержания Bcl-2 лимфоцитов крови человека после комплексного воздействия монооксида углерода (60, 75 и 90 мин.) и рекомбинантного интерлейкина-2 методом иммуноферментного анализа

Добавление рИЛ-2 (0,10 нг/мл) в среду с лимфоидными клетками приводило к статистически значимому уменьшению концентрации белка Bcl-2 через 24 ч. до значения $3,2 \pm 0,005$ нг/мл (на 50,7%) по сравнению с соответствующим контрольным значением (проапоптотический эффект). У СО-модифицированных клеток (60, 75 и 90 мин.) наблюдалось увеличение содержания изучаемого белка на 87,3%; в 5,0 и 2,7 раза соответственно относительно таких же образцов без добавления цитокина (Рис. 19).

Рис. 19. Содержание антиапоптотического белка Bcl-2 лимфоцитов крови человека после комплексного действия монооксида углерода (60, 75 и 90 мин.) и рИЛ-2 (0,10 нг/мл) через 24 ч. инкубирования клеток



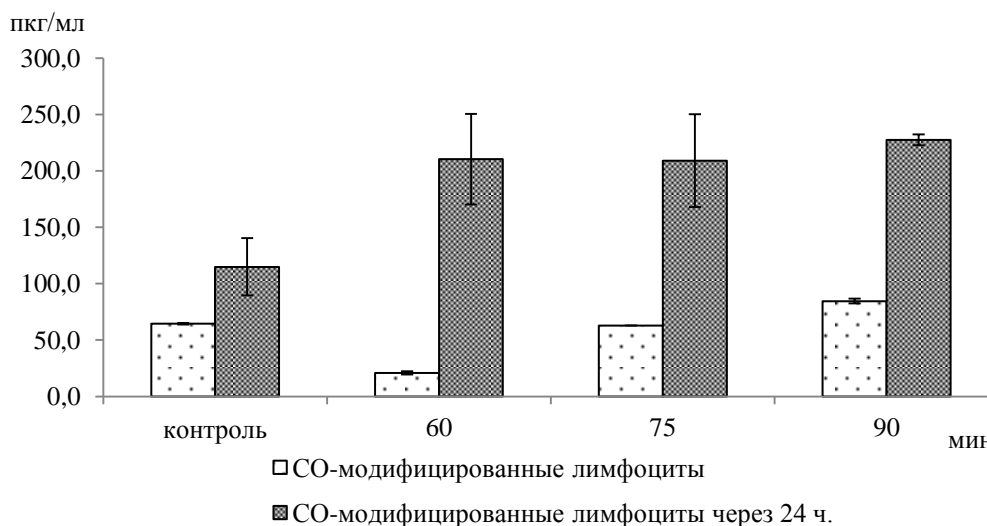
Механизм проапоптотического эффекта рИЛ-2 в настоящее время до конца не изучен. Среди множества факторов, опосредующих эффекты цитокинов на развитие апоптоза, выделяют митохондриальные (цитохром *c*, AIF, ионы кальция, Araf-1 и др.) (G. Kroemer, J.C. Reed, 2000). Bcl-2 контролирует выход в цитозоль митохондриальных факторов, участвующих в регуляции ПКГ (A. Gross, J.M. McDonnell, S.J. Korsmeyer, 1999). Таким образом, можно констатировать, что мо-

нооксид углерода оказывает влияние на экспрессию белка Bcl-2 de novo через 24 ч. термостатирования лимфоидных клеток.

3.12. Исследование содержания антиапоптозного белка сурвивина в лизате лимфоцитов крови человека после воздействия монооксида углерода (60, 75 и 90 мин.) до и после их суточного термостатирования

Средняя активность белка сурвивина в лимфоцитах крови человека составила $64,5 \pm 1,0$ пкг/мл. После инкубирования иммуноцитов в течение 60 мин. в атмосфере монооксида углерода активность белка снизилась на 67,4% по сравнению с контролем. Выявлено, что в лизатах СО-модифицированных в течение 75 мин. клеток происходило повышение активности сурвивина до контрольных значений ($63,0 \pm 0,2$ пкг/мл), однако, через 90 мин. этот показатель статистически достоверно увеличивался на 31,0% ($84,5 \pm 2,1$ пкг/мл) (Рис. 20).

Рис. 20. Содержание белка сурвивина в лизатах СО-модифицированных лимфоцитов (60, 75 и 90 мин.) до и после суточного термостатирования образцов



Через 24 ч инкубирования контрольных лимфоцитов в среде RPMI-1640 в термостате содержание белка сурвивина возросло до значения $115,0 \pm 25,5$ пкг/мл.

Суточное хранение СО-модифицированных лимфоцитов крови человека (60, 75 и 90 мин) приводило к гиперактивации сурвивина. Так, происходило воз-

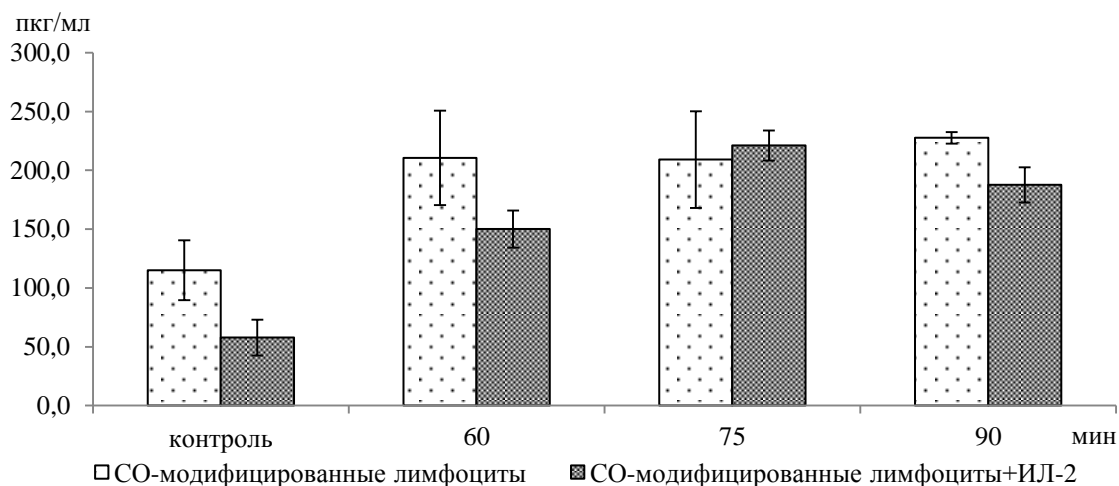
растание концентрации в 10,0; 3,3 и в 2,7 раза по сравнению с иммунными клетками без инкубации в термостате.

Таким образом, монооксид углерода, возможно, запускает пролиферацию внутриклеточных структур лимфоцитов через 24 ч. нахождения в термостате и повышает выживаемость этих клеток путем увеличения активности антиапоптозного фактора – сурвивина.

3.13. Исследование содержания антиапоптозного белка сурвивина лимфоцитов крови человека после комплексного воздействия монооксида углерода (60, 75 и 90 мин.) и рекомбинантного интерлейкина-2 методом иммуноферментного анализа

В присутствии рИЛ-2 (0,10 нг/мл) содержание сурвивина (также как и в случае с Вc1-2) в лимфоцитах крови человека уменьшается до значения $57,8 \pm 15,3$ пкг/мл (на 49,7%) по сравнению с такими же образцами без добавления цитокина. У СО-модифицированных в течение 60 и 90 мин. лимфоцитов рИЛ-2 способствовал падению содержания антиапоптозного белка на 28,7% и 17,6% соответственно по сравнению с такими же образцами в отсутствие рИЛ-2 в апоптоз-индуцирующей дозе (Рис. 21).

Рис. 21. Содержание антиапоптозного белка сурвивина лимфоцитов крови человека после комплексного действия монооксида углерода (60, 75 и 90 мин.) и рИЛ-2 через 24 ч. инкубирования



Итак, после добавления рИЛ-2 в систему СО-модифицированных (60 и 90 мин.) лимфоидных клеток наблюдалось уменьшение продукции сурвивина, что указывает на преобладание других путей дизрегуляции апоптоза в анализируемых условиях.

Таким образом, предположительно, монооксид углерода вносит существенный вклад в реализацию последовательности внутриклеточных событий, приводящих к программируемой клеточной гибели лимфоцитов в условиях воздействия рИЛ-2 (0,10 нг/мл). Возможно, этот газовый мессенджер направленно ингибирует выход антиапоптозного белка Bcl-2 из митохондрий, тормозя таким образом развитие ПКГ.

Глава 4. ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ МОНООКСИДА УГЛЕРОДА НА ЭРИТРОЦИТЫ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА

4.1. Исследование влияния монооксида углерода (60, 75 и 90 мин.) на поверхностную архитектуру эритроцитов крови человека методом скани- рующей электронной микроскопии

Развитие патологических процессов в результате воздействия различных химических агентов может сопровождаться изменением поверхностной архитектуры клеток крови человека. В условиях непосредственного контакта в периферическом русле эти агенты могут оказывать влияние на структурно-функциональные системы, ответственные за сохранность целостности их мембраны. Цитоархитектура эритроцитов определяет функциональные свойства как самой клетки, так и состояние мембран организма в целом (В.А. Левтов, С.А. Регирер, 1982).

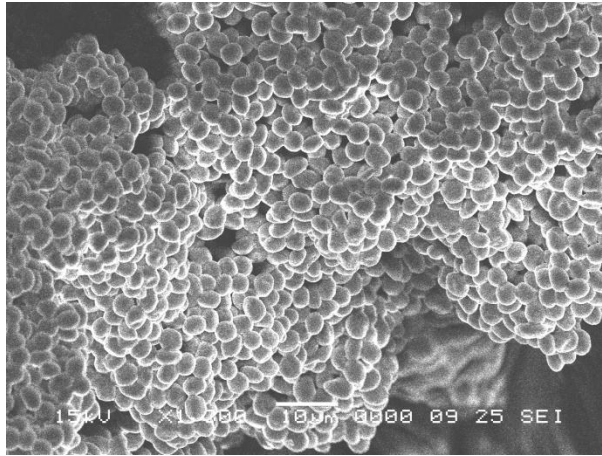
С целью выявления возможного повреждения мембран эритроцитов после воздействия оксида углерода (II) нами были изучены структурные изменения поверхностной архитектуры эритроцитов крови человека с помощью метода сканирующей электронной микроскопии.

Экспозиция эритроцитов в атмосфере монооксида углерода составляла 60, 75 и 90 мин.

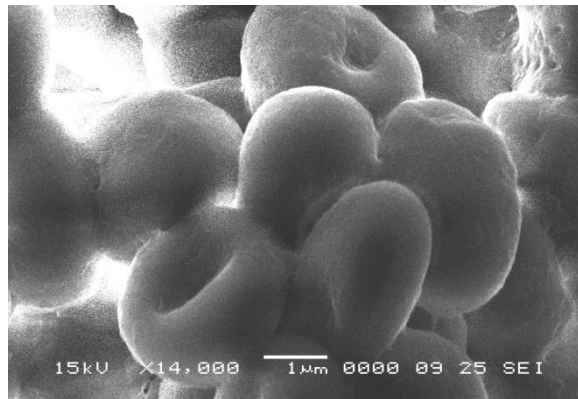
При морфологическом исследовании рельефа поверхности интактных эритроцитов было показано, что в контрольных образцах крови подавляющее большинство эритроцитов имело форму дискоцитов – $93,17 \pm 1,07\%$ (Рис. 22 а, б).

Рис. 22. Поверхностная архитектура эритроцитов крови человека в контрольных образцах (*а* – при увеличении 1300; *б* – при увеличении 14000)

а



б



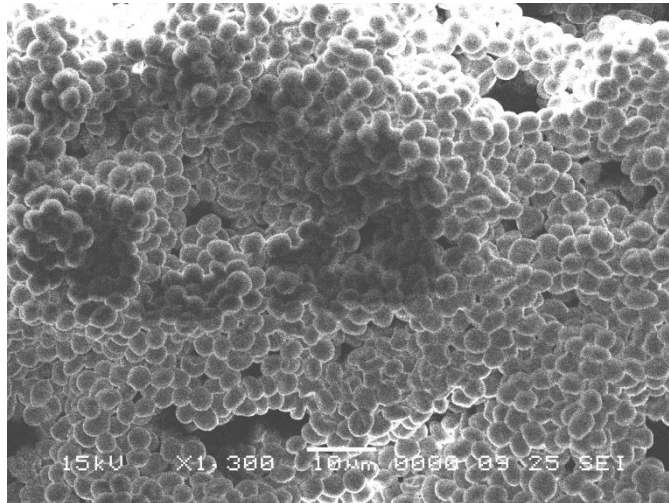
Изучение поверхностной архитектуры эритроцитов выявило изменение процентного соотношения отдельных морфологических форм эритроцитарных клеток доноров в течение всего периода экспозиции в атмосфере монооксида углерода (Табл. 5).

После воздействия на исследуемые клетки крови оксида углерода (II) в течение 60 мин. происходит образование межклеточных контактов с конечным результатом – агрегацией эритроцитарных клеток (Рис. 23 а, б). В этот период содержание дискоцитов по сравнению с их количеством в контрольной группе было снижено в среднем на 61,74%. Среди переходных форм эритроцитов, которые способны к обратимой деформации, увеличивалось содержание эллипсов (на 20,2%), дискоцитов с одним (на 17,6%) и множественными выростами (на 4,67%) по сравнению с их количеством в крови контрольной группы. Численность попу-

ляции необратимо трансформированных СО-модифицированных в течение 60 мин. эритроцитов в форме «спущенного мяча» возрастала в среднем на 23,6% по сравнению с интактными клетками.

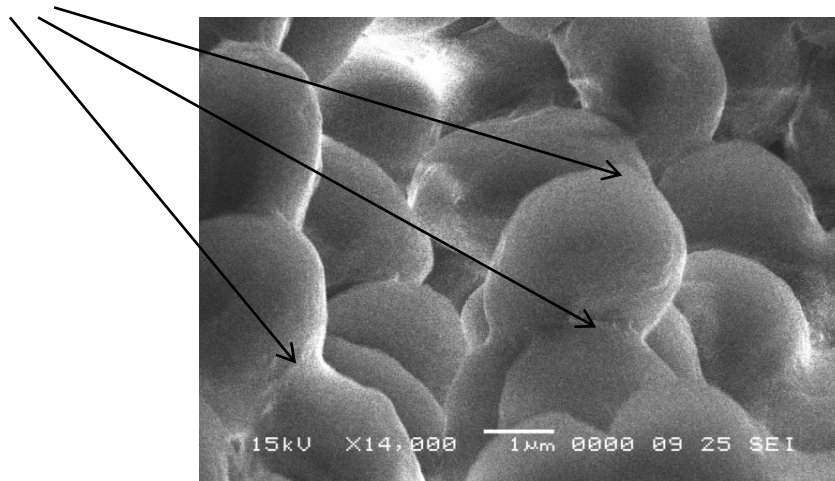
Рис. 23. Поверхностная архитектура эритроцитов крови человека после воздействия оксида углерода (II) в течение 60 мин. (*а* – при увеличении 1300; *б* – при увеличении 14000)

а



б

Агрегированные клетки:

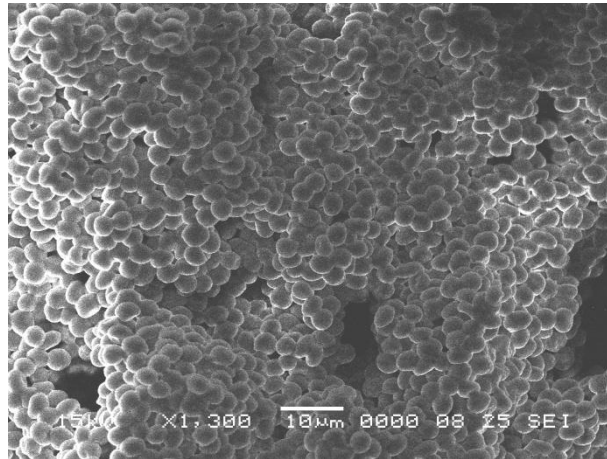


В результате последующей СО-модификации продолжительностью 75 мин. (Рис. 24 а, б) выявляется существенное изменение дискообразной формы эритроцитов с образованием дискоцитов в виде «спущенного мяча» ($23,5 \pm 1,6\%$), что ха-

рактируется нарушением рельефа клеточной поверхности, образованием выростов на поверхности эритроцитов и уменьшением их размеров.

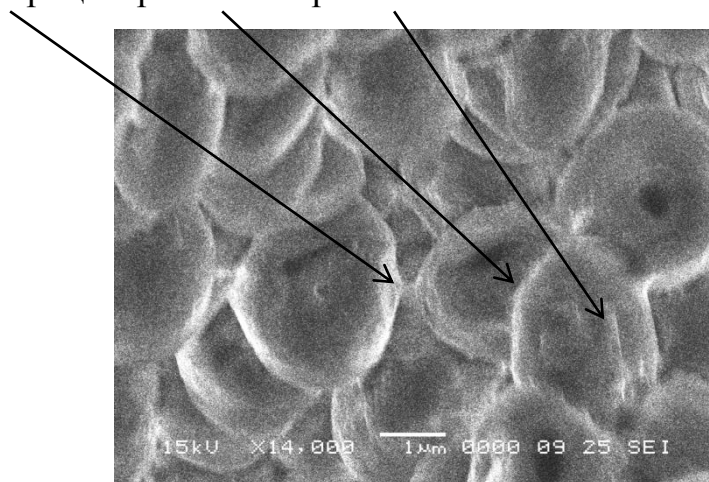
Рис. 24. Поверхностная архитектура эритроцитов крови человека после воздействия оксида углерода (II) в течение 75 мин.: (а – при увеличении 1300; б – при увеличении 14000)

а



б

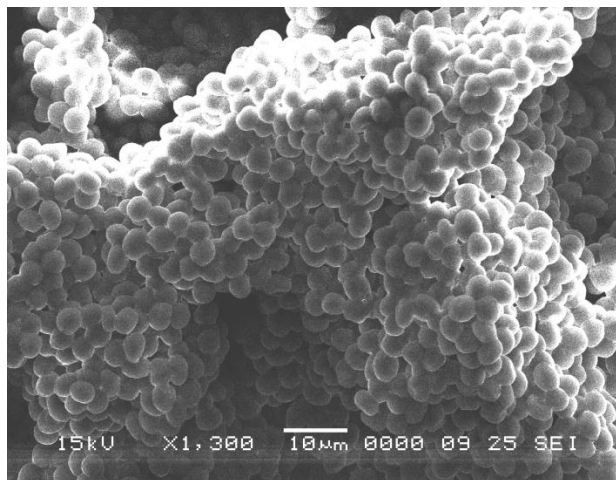
Выросты эритроцитарных мембран:



При анализе СО-модифицированных в течение 90 мин. эритроцитов (Рис. 25 а, б), выявляется возрастание степени агрегации изучаемых клеток с еще большим отклонением от нормы: они принимают сферическую форму, видны участки эритроцитарных мембран, нарушается рельеф клеточной поверхности.

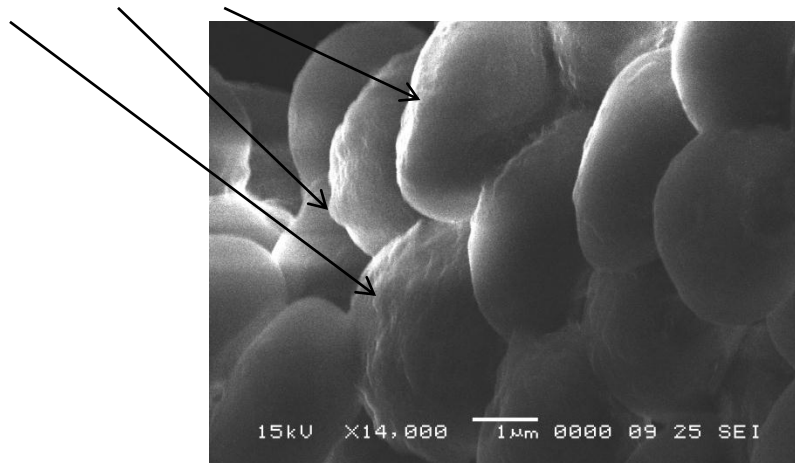
Рис. 25. Поверхностная архитектура эритроцитов крови человека после воздействия оксида углерода (II) в течение 90 мин.: (а – при увеличении 1300; б – при увеличении 14000)

а



б

Выросты эритроцитарных мембран:



Таким образом, при длительном воздействии оксида углерода (II) на эритроциты крови человека (75÷90 мин.) происходит увеличение числа клеток с множественными выростами, эритроцитов «в виде спущенного мяча» и, как следствие, – изменение поверхностной архитектуры анализируемых нами клеток.

У эритроцитов, подвергшихся 90-минутной инкубации в атмосфере CO, наблюдалось наибольшее изменение показателей ИТ, ИОТ и ИНОТ (Табл. 5).

Таблица 5. Цитоархитектоника эритроцитов крови доноров, модифицированных монооксидом углерода (60, 75 и 90 мин.)

Морфологическая форма	Интактные эритроциты	СО-модифицированные в течение 60 мин. эритроциты	СО-модифицированные в течение 75 мин. эритроциты	СО-модифицированные в течение 90 мин. эритроциты
Нормальные дискоциты	93,17±1,07	31,43±1,21*	25,20±1,37*	7,43±0,36*
Обратимо трансформируемые эритроциты				
Эллипсы	0,1±0,0	20,3±1,5*	11,0±2,9*	12,3±0,8*
Дискоциты с выростом	0,5±0,2	18,1±0,7*	15,5±0,3*	32,2±2,3*
Дискоциты с множественными выростами	1,43±0,07	6,10±0,85*	14,5±1,05*	6,7±0,41*
Необратимо трансформируемые эритроциты				
В виде «спущенного мяча»	1,73±0,07	25,33±2,85*	23,5±1,6*	12,33±2,85*
Сфероциты с гладкой поверхностью	2,5±0,2	1,0±0,8*	10,2±0,5*	31,0±0,6*
ИТ, отн. ед.	0,07±0,0	2,17±0,13*	2,97±0,17*	12,87±0,65*
ИОТ, отн. ед.	0,02±0,0	1,40±0,08*	1,63±0,17*	7,03±0,51*
ИНОТ, отн. ед.	0,05±0,0	0,73±0,07*	1,33±0,12*	5,83±0,36*

* – отклонения исследуемого показателя относительно значений в интактной группе статистически значимы.

По своей природе монооксид углерода липофилен, и, проникая в эритроцит, взаимодействует с гемоглобином, вызывает формирование структурных дефектов, проявляющихся, в конечном итоге, в образовании углублений на поверхности клетки. Выявленные изменения морфологической картины мембраны эритроцитов крови человека могут быть связаны с интенсификацией процессов перекисного окисления липидов (ПОЛ). В данном случае причиной гиперактивации реакций свободнорадикального повреждения биомолекул, вероятнее всего, является ярко выраженная гипоксия смешанного генеза, инициированная СО. Продукты ПОЛ для липидных и белковых компонентов биологических мембран нарушают их

взаимодействие, приводят к снижению ее текучести, а, следовательно, к изменению ее формы. Нарушение липидного слоя эритроцитарной мембраны может привести к дезорганизации трансбислойной асимметрии распределения фракций фосфолипидов, увеличению микровязкости мембраны эритроцитов, а также дисбалансу основных транспортных систем, нарушение активности которых закономерно ведет к дизрегуляции ионного гомеостаза (В.В. Новицкий, Н.В. Рязанцева, 2003).

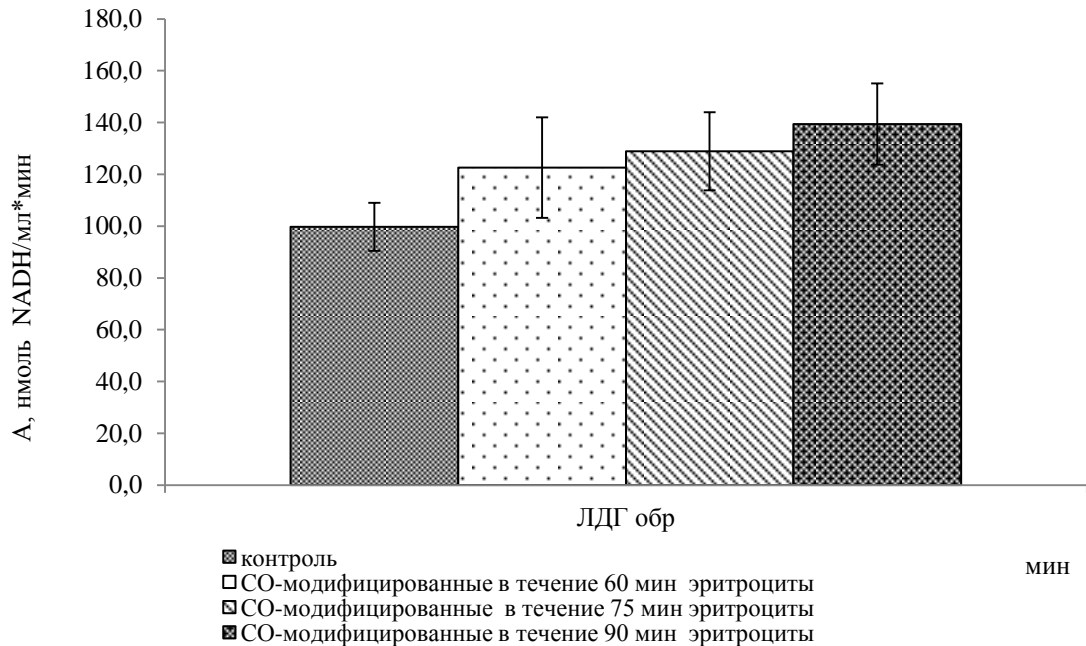
Таким образом, монооксид углерода вызывает гетерогенные изменения поверхностной архитектоники в популяции эритроцитов: увеличивается индекс трансформации клеток, появляется большое количество обратимо деформированных клеток, снижается доля дискоцитов. Выявленные нарушения структурных свойств эритроцитов свидетельствуют о нарушении функциональной активности эритроцитов после воздействия СО в течение 60, 75 и 90 мин.

4.2. Исследование влияния монооксида углерода (60, 75 и 90 мин.) на энергетический метаболизм эритроцитов крови человека

4.2.1. Исследование активности лактатдегидрогеназы в прямой и обратной реакции после воздействия монооксида углерода (60, 75 и 90 мин.) на эритроциты крови человека

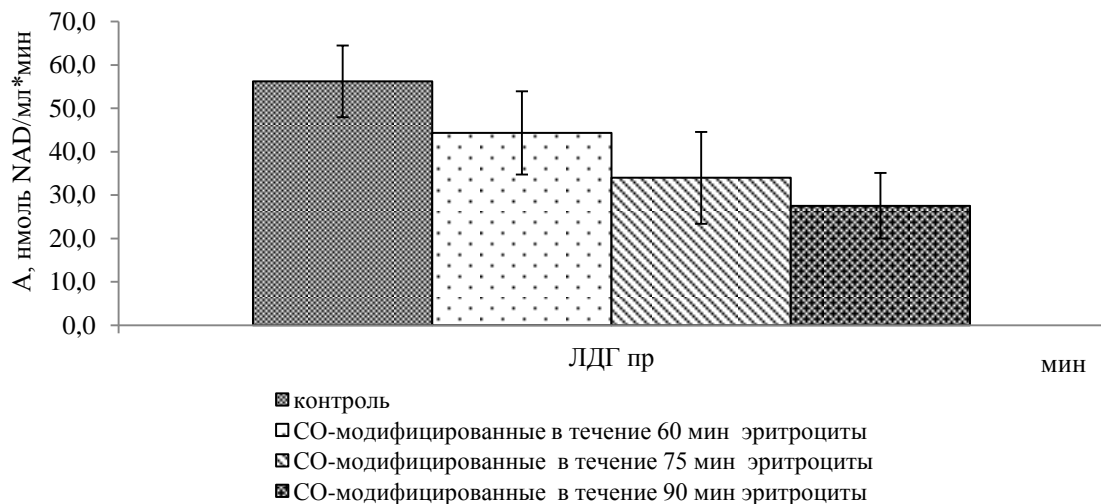
Проведенные исследования позволили установить, что активность эритроцитарной ЛДГ в обратной реакции (ЛДГобр.) составила $99,8 \pm 9,3$ нмоль NADH/мл·мин. Воздействие СО на эритроциты крови человека в течение 75 и 90 мин. индуцировало статистически значимое увеличение активности ЛДГобр. до значений $128,9 \pm 15,1$ и $139,4 \pm 15,7$ нмоль NADH/мл·мин соответственно (на 29,2% и 39,7% по сравнению с контролем) (Рис. 26).

Рис. 26. Активность ЛДГ (А) в обратной реакции СО-модифицированных эритроцитов крови человека



Каталитическая активность ЛДГ в прямой реакции (ЛДГ пр.) в гемолизате эритроцитарной массы равнялась $56,2 \pm 8,3$ нмоль NAD/мл·мин. Модификация эритроцитов крови человека монооксидом углерода в течение 75 и 90 мин. приводила к снижению изучаемого показателя до значений $34,0 \pm 10,6$ и $27,5 \pm 7,5$ нмоль NAD/мл·мин соответственно (на 39,5% и 51,1% относительно контрольного образца). (Рис. 27).

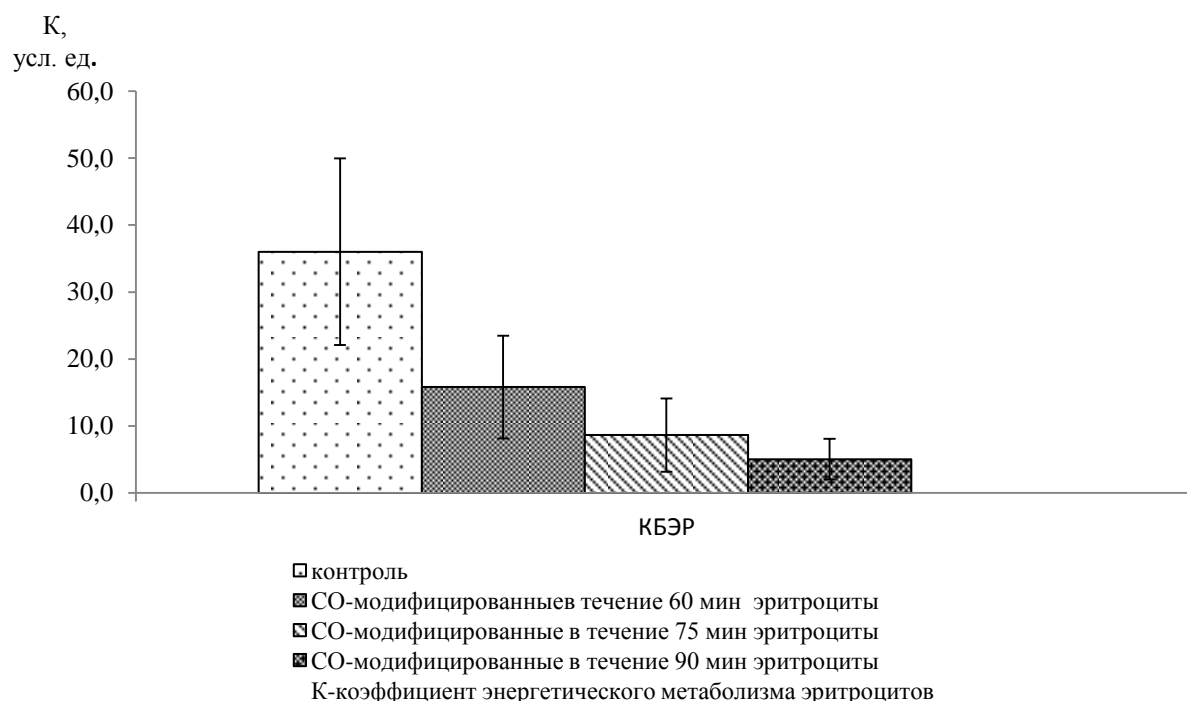
Рис. 27. Активность ЛДГ (А) в прямой реакции СО-модифицированных эритроцитов крови человека



Таким образом, наши исследования позволили отметить, что монооксид углерода может предотвращать избыточную активацию ЛДГобр., способствующую синтезу лактата – известного молекулярного маркера гипоксии (А.К. Мартусевич, А.Г. Соловьева, 2013).

Для получения интегральной оценки состояния рассматриваемого звена энергетического метаболизма был произведен расчет коэффициента баланса энергетических реакций (КБЭР). Выявлено выраженное смещение режима функционирования ЛДГ: с существенной активацией обратной реакции на фоне угнетения прямой, наблюдавшейся при инкубации в атмосфере монооксида углерода, что проявилось в резком снижении КБЭР (в среднем на 72,3%) по сравнению с контрольным значением. Этот сдвиг может отражать системную метаболическую дезадаптацию, формирующуюся в условиях воздействия монооксида углерода. (Рис. 28.).

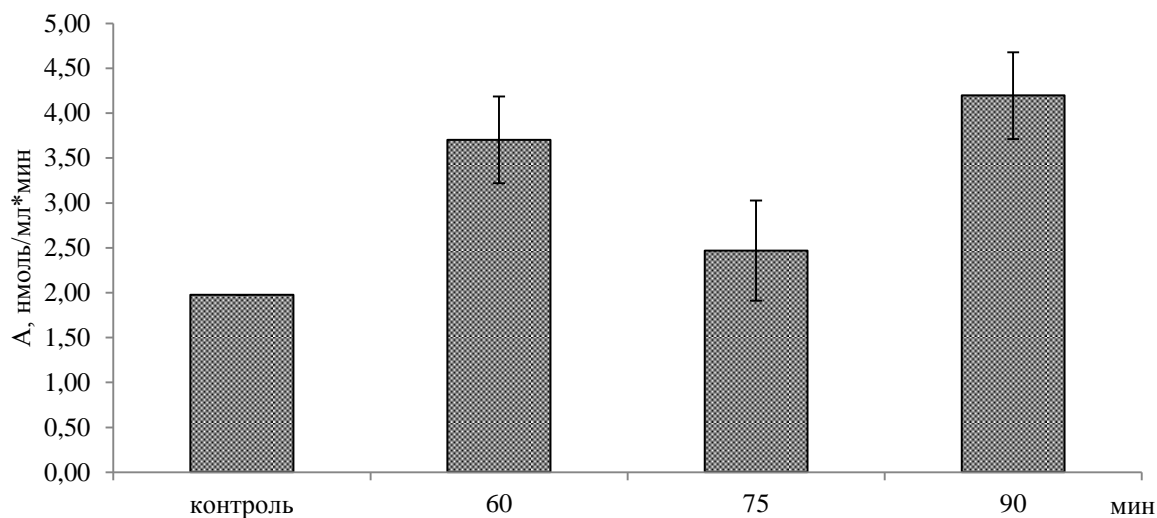
Рис. 28. Производный коэффициент энергетического метаболизма эритроцитов в норме и при инкубации их в атмосфере монооксида углерода



4.2.2. Исследование активности глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы после воздействия монооксида углерода (60, 75 и 90 мин.) на эритроциты крови человека

Активность глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы эритроцитов крови человека после экспозиции клеток в атмосфере монооксида углерода в течение 60 и 90 мин. возрастала на 46,8% и 53,1% соответственно относительно нативного образца. У СО-модифицированных в течение 75 мин. анализируемых клеток ферментативная активность глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы снижалась на 49,8% по сравнению с инкубированными в течение 60 мин. в атмосфере монооксида углерода эритроцитами и достигала контрольных значений (Рис. 29).

Рис. 29. Активность (А) глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы СО-модифицированных эритроцитов крови человека



Таким образом, нами показано, что при воздействии монооксида углерода в течение 60 мин. на эритроциты крови человека, возможно, усиливается начальный этап пентозофосфатного пути (увеличивается активность глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы). Однако через 75 мин. воздействия СО наблюдается сдвиг в катаболизме глюкозы, уменьшение энергетического потенциала эритроцитов, что, в свою очередь, может способствовать изменению структурного состояния и, следовательно, проницаемости мембраны – основного фактора, ограничивающего

поступление молекулы СО в клетку. Не исключено, что именно на этом этапе могут инициироваться процессы изменения целостности мембран СО-модифицированных эритроцитов. Метаболизм анализируемых клеток в атмосфере монооксида углерода (90 мин.) претерпевает компенсаторные изменения, направленные на сохранение функциональной активности эритроцитов крови человека.

Некоторые из описанных эффектов, на наш взгляд, получили подтверждения данных, полученных при исследовании поверхностной архитектоники эритроцитов в условиях модификации монооксидом углерода.

Глава 5. ИССЛЕДОВАНИЕ ВОЗДЕЙСТВИЯ УФ-СВЕТА НА ЛИМФОЦИТЫ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА

5.1. Исследование воздействия УФ-света (151, 453 и 755 Дж/м²) на уровень экспрессии CD95 рецепторов лимфоцитов крови человека методом проточной цитофлуориметрии

Средняя интенсивность флуоресценции интактных лимфоцитов составила $3,02 \pm 0,17$ усл. ед. Облучение иммуноцитов УФ-светом в дозе 151 Дж/м² не приводило к статистически значимым изменениям выраженности экспрессии CD95 маркеров по сравнению с контролем. УФ-излучение в дозах 453 и 755 Дж/м² вызывало повышение тестируемого показателя, что выражалось в возрастании его значений соответственно на 13,3% и 12,6% относительно интактных клеток (Рис. 30, 31).

Рис. 30. Величины средней интенсивности флуоресценции CD95 маркеров на поверхности лимфоцитов крови человека, модифицированных УФ-светом (151, 453 и 755 Дж/м²)

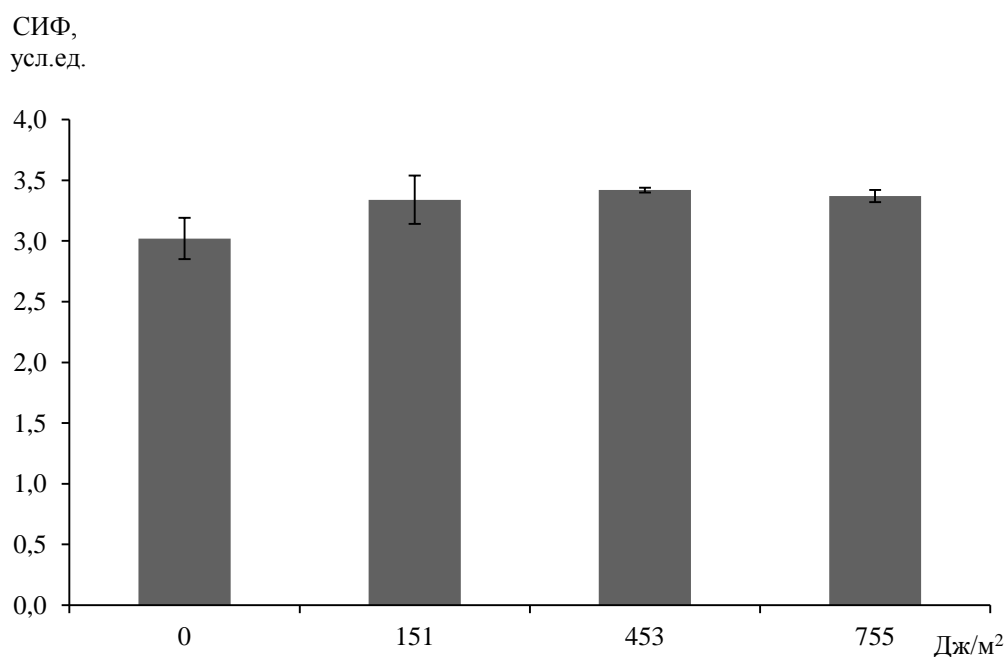
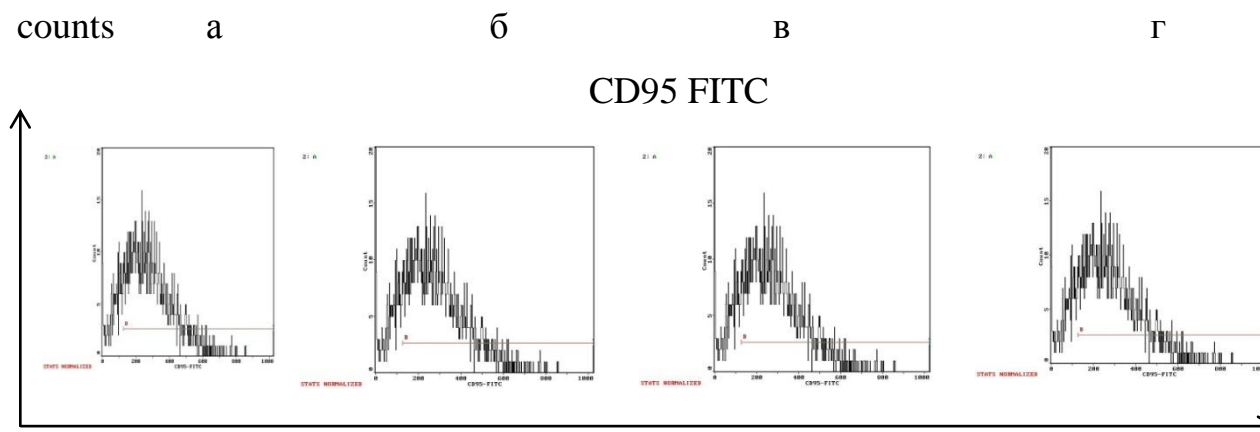


Рис. 31. Однопараметрические гистограммы изменения уровня экспрессии CD95-маркеров на поверхности лимфоцитов крови человека, модифицированных УФ-светом (специфическое окрашивание клеток, с которыми связывается значительное количество FITC-меченных антител к CD95), а – контрольные образцы; б, в, г – УФ-модифицированные образцы соответственно 151, 453, 755 Дж/м²



В результате проведенных экспериментов показано, что УФ-свет в дозах 453, 755 Дж/м², по всей вероятности, проявляет проапоптотическое действие: возрастание количества маркера CD95 на поверхности мембран является предпосылкой к развитию ПКГ.

Увеличение экспрессии Fas-маркеров может быть обусловлено, в первую очередь, синтезом молекул *de novo*, чему в данных условиях будет способствовать интенсификация процессов ПФОЛ клетки. Известно, что инициаторы ПФОЛ, в том числе и гидропероксиды липидов, могут выступать в роли вторичных мессенджеров и в качестве триггеров синтеза белков путем активации факторов транскрипции (S. Legrand-Poels, 1998). Эти факторы связываются с промоторным участком гена и запускают транскрипцию, а, следовательно, и трансляцию соответствующего белка (Y.M.W. Janssen-Heininger, M.E. Poynter, P.A. Baeuerle, 2000; Е.Е. Дубинина, 2001; K. Schulze-Osthoff, M. Los, P. Baeuerle, 1995). Помимо образования новых рецепторных молекул, увеличению тестируемого показателя будут способствовать изменение конформации CD95-рецепторов в результате прямого или опосредованного действия на их структуру УФ-света, высвобождение из мембраны предшествующих молекул исследуемых маркеров, переориентировка последних на поверхности клетки (кэппинг-эффекты) (В.Г. Артюхов, О.В. Путин-

цева, С.М. Дубова и др. 2012; В.Г. Артюхов, О.В. Путинцева, В.А. Вдовина и др. 2011).

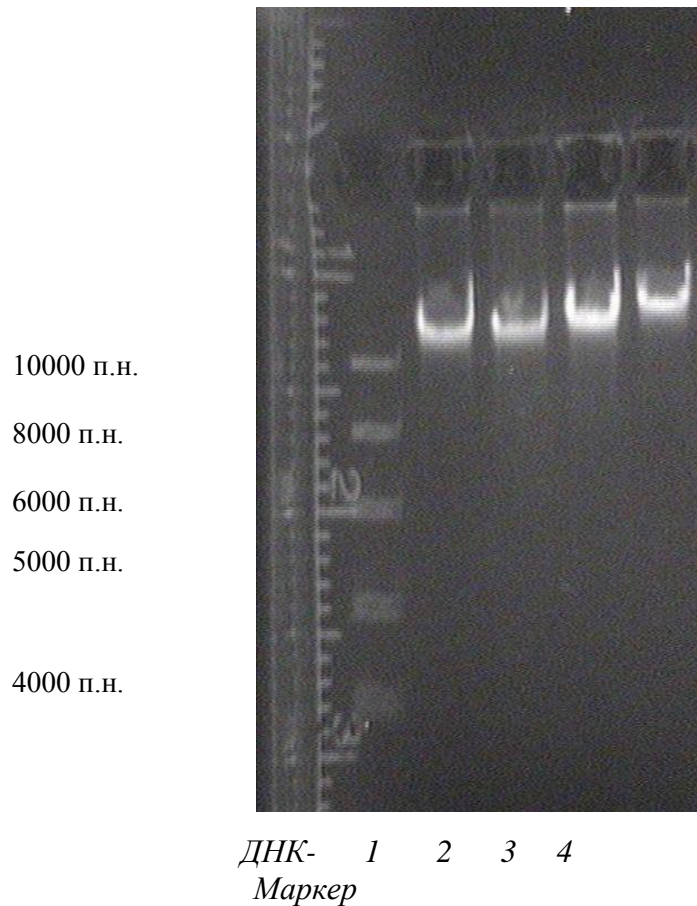
5.2. Исследование воздействия УФ-света (151, 453 и 755 Дж/м²) на структурное состояние ДНК лимфоцитов крови человека методом электрофореза в агарозном геле до и после их суточного термостатирования

Изучение электрофореграмм образцов ДНК иммуноцитов, подвергшихся УФ-облучению в дозах 151, 453 и 755 Дж/м², выявило снижение величины ЭФП изучаемой молекулы до значений 1,25; 1,20; 1,10 см соответственно (Рис. 32).

Изменение ЭФП молекулы ДНК УФ-облученных лимфоцитов крови человека указывает на «утяжеление» фрагментов геномной ДНК, возможно, за счет образования ДНК-белковых сшивок в нуклеопротеидах генов. Снижение величины исследуемого показателя не может быть обусловлено разрывами в макромолекуле ДНК, так как такие фрагменты могли стать основой для возникновения так называемой «апоптозной лестницы». Известно, что однонитевые разрывы ДНК являются начальными событиями фрагментации макромолекулы в ходе активации процесса вырезания ферментами репарации пиримидиновых димеров, а также перехода клеток в состояние апоптоза (В.Г. Артюхов, М.С. Трубицына, М.А. Наквасина и др., 2011; В.М. Ozawa, K. Ferenczi et al., 1999). По всей видимости, индуцируемая после УФ-облучения лимфоцитов репарация ДНК от пиримидиновых димеров с образованием однонитевых разрывов ДНК, сопровождающаяся их значительным накоплением и образованием двунитевых разрывов макромолекулы, в особенности при запуске процесса апоптоза с межнуклеосомной фрагментацией ДНК (В.А. Тронов, Д.Г. Терещенко, М.А. Коноплянников, 1998) и появлением на электрофореграмме характерной «апоптозной лестницы», в нашем случае не происходит. Мы не наблюдали образования «апоптозной лестницы», т.е. процессов ПКГ. Поэтому уменьшение электрофоретической подвижности (с 1,30 см до 1,10 см) указывает на образование сшивок между макромолекулой ДНК и белками нуклеопротеида.

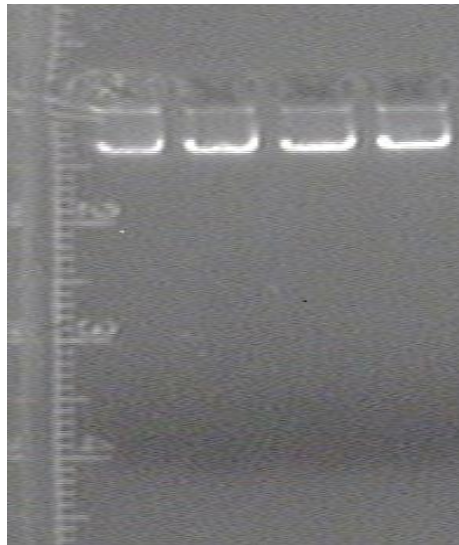
Таким образом, индуцируемые УФ-светом ($151 - 755 \text{ Дж/м}^2$) процессы в молекуле ДНК лимфоцитов крови человека указывают на структурную модификацию молекулы нуклеиновой кислоты.

Рис. 32. Электрофореграмма ДНК лимфоцитов до (1) и после воздействия УФ-света в дозах 151 (2), 453 (3) и 755 (4) Дж/м^2



После 24 ч. нахождения УФ-модифицированных ($151, 453$ и 755 Дж/м^2) лимфоцитов в термостате (37°C) не наблюдалось изменений ЭФП молекулы ДНК, т.е. развития структурных нарушений при этом не происходило (Рис. 33).

Рис. 33. Электрофореграмма ДНК лимфоцитов до (1) и в условиях воздействия УФ-света в дозах 151 (2), 453 (3) и 755 (4) Дж/м² после суточного термостатирования клеток

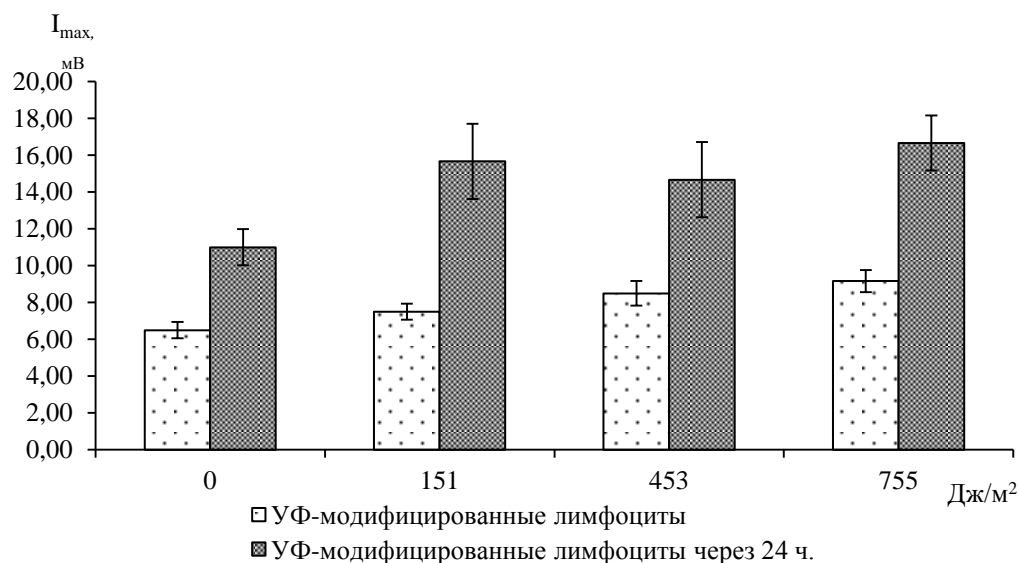


5.3. Исследование люминолзависимой биохемилюминесценции лимфоцитов крови человека после воздействия УФ-света (151, 453 и 755 Дж/м²) до и после их суточного термостатирования

Выявлено, что непосредственно после воздействия УФ-излучения в дозах 151, 453 и 755 Дж/м² на суспензию лимфоцитов обнаруживается дозозависимое увеличение интенсивности спонтанной люминол-зависимой хемилюминесценции клеток (I_{max}). Так, облучение в максимальной дозе – 755 Дж/м², индуцировало возрастание анализируемого показателя на 41,1% (до значения $9,17 \pm 0,6$ мВ).

После суточного термостатирования наблюдалось увеличение анализируемого показателя УФ-модифицированных лимфоцитов (151, 453 и 755 Дж/м²) на 108,9%, 72,6% и 81,8% соответственно (относительно таких же образцов без 24 ч. нахождения в термостате) (Рис. 34).

Рис. 34. Величины максимальной интенсивности хемилюминесценции (I_{\max}) УФ-модифицированных (151, 453 и 755 Дж/м²) лимфоцитов до и после их суточного термостатирования

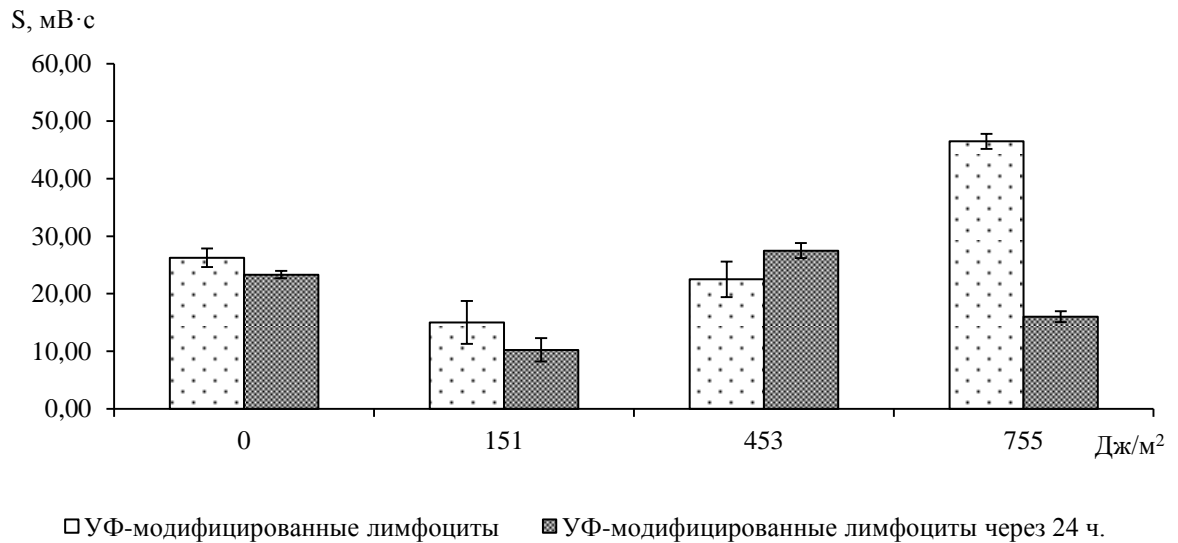


УФ-излучение в дозе 151 Дж/м² индуцировало уменьшение светосуммы хемилюминесценции лимфоцитов на 42,9%, а в дозе 755 Дж/м² – повышение исследуемого параметра на 76,6 % относительно контрольных значений (Рис. 35).

После суточного термостатирования образцов, облученных УФ-светом в дозе 755 Дж/м², происходило уменьшение величины светосуммы хемилюминесценции на 65,6% по сравнению с соответствующим образцом без 24 ч. пребывания в термостате. В остальных случаях статистически значимых отличий выявлено не было.

Таким образом, УФ-свет (151, 453, 755 Дж/м²) способствовал повышению показателя I_{\max} , что указывает на усиление свободнорадикальных процессов, а увеличение параметра светосуммы означает снижение антиоксидантной активности лимфоцитов крови человека. Полученные результаты свидетельствуют об инициации свободнорадикальных процессов, вызванных УФ-светом в иммунокомпетентных клетках.

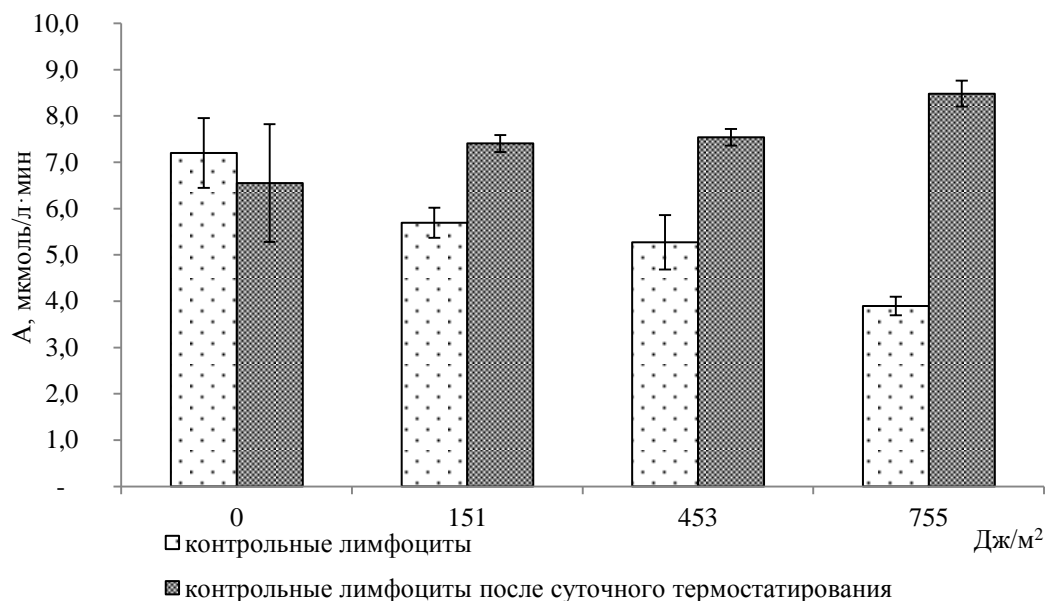
Рис. 35. Величины светосуммы (S) хемилюминесценции УФ-модифицированных (151, 453 и 755 Дж/м²) лимфоцитов до и после их суточного термостатирования



5.4. Исследование активности митохондриальной сукцинатдегидрогеназы лимфоцитов крови человека после воздействия УФ-света (151, 453 и 755 Дж/м²) до и после их суточного термостатирования

Выявлено, что непосредственно после УФ-облучения суспензии нативных лимфоцитов крови доноров в дозах 151, 453 и 755 Дж/м² в клетках происходит дозозависимое уменьшение функциональной активности митохондриальной сукцинатдегидрогеназы соответственно на 20,8%, 26,3% и 43,1% соответственно относительно контроля (Рис. 36).

Рис. 36. Влияние УФ-света на активность (А) митохондриальной сукцинатдегидрогеназы лимфоцитов до и после их суточного термостатирования



Инкубация иммуноцитов в течение 24 ч. позволила выявить увеличение активности митохондриальной СДГ у УФ-модифицированных иммунокомпетентных клеток в дозах 151 и 453 Дж/м² до контрольных значений свежевыделенных клеток ($7,4 \pm 0,2$ и $7,5 \pm 0,2$ мкмоль/л·мин), что составило 29,8% и 41,5% соответственно (относительно таких же образцов без суточного хранения). Воздействие УФ-света в дозе 755 Дж/м² способствовало статистически значимому возрастанию анализируемого показателя лимфоидных клеток на 18,0% по сравнению с контролем и на 117,9% по сравнению с образцами, не инкубированными в термостате 24 ч.

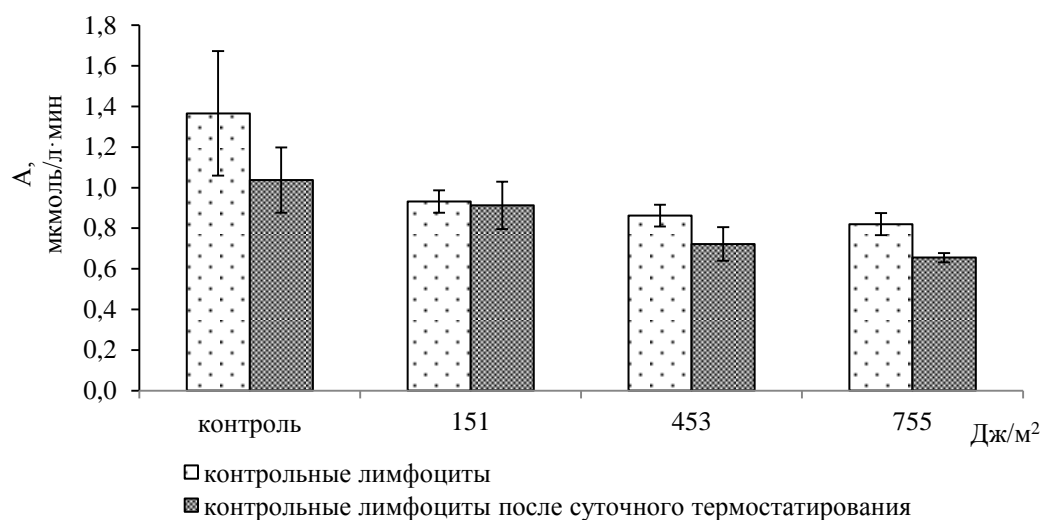
Сукцинатдегидрогеназа содержит в своем составе сульфгидрильные группы. Возможно, именно окисление SH-групп является одной из причин фотоинактивации молекул фермента.

Таким образом, через 24 ч. термостатирования УФ-модифицированных клеток (151, 453 и 755 Дж/м²) наблюдается преобладание аэробного пути окисления глюкозы, что позволяет клеткам снизить ее потребление в энергетических целях и сохранить достаточный уровень запаса АТФ.

5.5. Исследование активности цитохром *c* оксидазы митохондрий лимфоцитов крови человека после воздействия УФ-света (151, 453 и 755 Дж/м²) до и после их суточного термостатирования

Облучение суспензии нативных иммуноцитов в дозах 151, 453 и 755 Дж/м² приводит к снижению активности ЦО на 35,7%; 35,7%; и 42,9% соответственно относительно контрольных образцов (Рис. 37).

Рис. 37. Влияние УФ-света (151, 453 и 755 Дж/м²) на активность (А) митохондриальной цитохром *c* оксидазы лимфоцитов крови человека до и после их суточного термостатирования



После термостатирования лимфоцитов в течение 24 ч. выявлено снижение функциональной активности ЦО у УФ-модифицированных иммунокомпетентных клеток в дозах 453 и 755 Дж/м² в среднем на 30% по сравнению с контролем. Переключение субстратного потока преимущественно на анаэробный путь является причиной уменьшения концентрации АТФ в ходе суточной инкубации лимфоцитов (В.Г. Артюхов, О.В. Земченкова, О.В. Башарина и др., 2011). Выявленное снижение активности цитохром *c* оксидазы может быть обусловлено следующими причинами. Молекула цитохром *c* оксидазы содержит низкоспиновый гем *a* и высокоспиновый гем *a*₃, а также расположенные вблизи них ароматические остатки. Порфириновые кольца и ароматические кислоты поглощают УФ-свет, что может

приводить к нарушению активности фермента и его концентрации в системе (В.Г. Артюхов, О.В. Земченкова, О.В. Башарина и др., 2011).

Важной особенностью действия УФ-света на молекулярно-клеточном уровне является его зависимость от присутствия кислорода (R. Parshad, K.K. Sanford, 1977). Митохондрии являются основными потребителями кислорода в клетках. При поглощении квантов света ферментными системами осуществляется восстановление молекул кислорода, и образуются активные формы кислорода (АФК). УФ-облучение приводит к возрастанию продукции свободных радикалов, что стимулирует процессы ПФОЛ. В связи с тем, что внутренняя мембрана митохондрий содержит большое количество белков, в частности цитохром *c* оксидазу, она является одной из мишеней АФК в лимфоцитах. Стимулирование ПОЛ осложняет негативные эффекты, вызванные действием облучения (фотохимическая аллопатия) (С.В. Конев, И.Д. Волотовский, 1979).

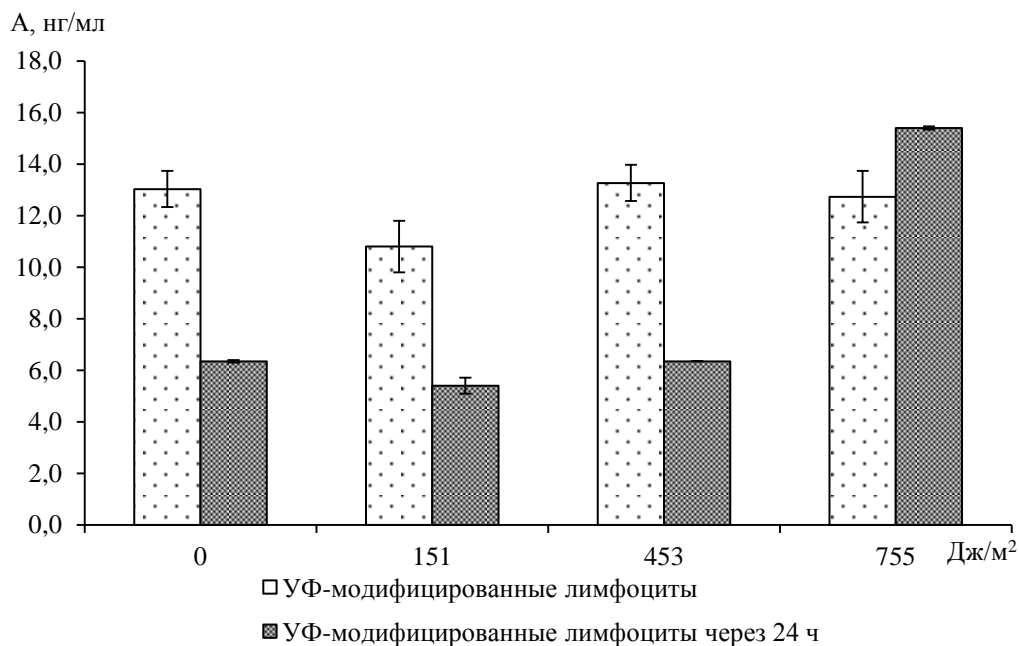
Таким образом, УФ-свет способствует фотоинактивации изученных нами митохондриальных ферментов, что приводит к снижению интенсивности как аэробного, так и анаэробного путей окисления глюкозы.

5.6. Исследование содержания антиапоптозного белка Bcl-2 лимфоцитов крови человека после воздействия УФ-света (151, 453 и 755 Дж/м²)

до и после их суточного термостатирования

Облучение лимфоцитов УФ-светом в дозе 151 Дж/м² приводило к статистически значимому уменьшению содержания белка Bcl-2 на 16,9% по сравнению с образцом без облучения. Воздействие УФ-света в дозах 453 и 755 Дж/м² на лимфоидные клетки способствовало повышению количества данного белка до первоначальных значений, но статистически значимых отклонений относительно контрольных величин выявлено не было (Рис. 38).

Рис. 38. Влияние УФ-света (151, 453 и 755 Дж/м²) на содержание (А) антиапоптозного белка Bcl-2 лимфоцитов крови человека до и после их суточного термостатирования



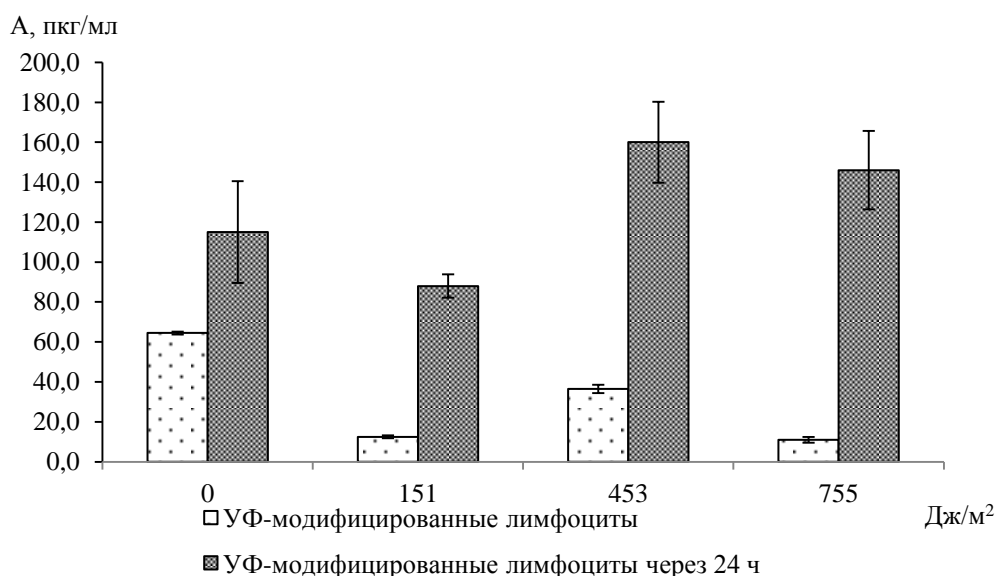
После хранения интактных иммуноцитов в термостате (37 °С) наблюдалось статистически значимое снижение содержания белка Bcl-2 до значения $6,35 \pm 0,05$ нг/мл (на 51,2%). Падение количества анализируемого белка наблюдалось также у УФ-модифицированных лимфоцитов (151 и 453 Дж/м²) через 24 ч. по сравнению с такими же образцами без суточного хранения (на 50,0%, 52,3% соответственно). Однако УФ-свет в дозе 755 Дж/м² через 24 ч. инкубации в термостате способствовал синтезу антиапоптозного белка de novo на 21,3% по сравнению с таким же образцом без термостатирования, и на 18,5% по сравнению с контролем. Повышение содержания Bcl-2 через 24 ч. после УФ-воздействия на лимфоидные клетки в дозе 755 Дж/м² позволяет расценивать этот факт как усиление процесса апоптоза. Данный белок осуществляет сложный контроль за состоянием каналов митохондриальных мембран и выходом в цитозоль проапоптотических митохондриальных факторов таких как цитохром c, AIF, Araf-1, прокаспазы-2, 3, 9 (J.M. Adams, 2003; T. Dragovich, C.M. Rudin, C.B. Thompson, 1998; P.C. Kam, N.I. Ferch, 2000). При воздействии стрессовых стимулов белок Bcl-2, локализуясь в мембране митохондрий, закрывает каналы, предотвращая тем самым выход

проапоптогенных факторов из межмембранного пространства (Е.Н. Cheng, М.С. Wei, Weiler S., 2001; G. Kroemer, J.C. Reed, 2000).

5.7. Исследование содержания антиапоптозного белка сурвивина лимфоцитов крови человека после воздействия УФ-света (151, 453 и 755 Дж/м²) до и после их суточного термостатирования

Концентрация сурвивина в контрольных образцах лизатов лимфоцитов крови человека составила $64,5 \pm 0,7$ пкг/мл. После 24-ч. нахождения исследуемых объектов в термостате анализируемый показатель статистически значимо увеличился до значения $115,0 \pm 25,5$ пкг/мл (Рис. 39). УФ-свет в дозах 151, 453 и 755 Дж/м² способствовал снижению содержания белка на 80,6%, 43,4% и 82,9% (соответственно до значений $12,5 \pm 0,7$; $36,5 \pm 2,1$; $11,0 \pm 1,4$ пкг/мл) по сравнению с контролем. Через 24 ч. инкубации в термостате происходило статистически значимое увеличение количества изучаемого антиапоптозного белка по сравнению с такими же образцами без суточного хранения в 7; 4,4 и в 13,3 раза.

Рис. 39. Влияние УФ-света (151, 453 и 755 Дж/м²) на содержание (А) антиапоптозного белка сурвивина лимфоцитов крови человека до и после их суточного термостатирования



Сурвивин, относящийся к семейству антиапоптозных белков XIAP, ингибирует каспазы-3, 7, 9, используя BIR-домены. Экспрессия сурвивина *in vitro* увеличивает резистентность клеток к апоптозу (S.K. Chiou, M.K. Jones, A.S. Tarnawski, 2003). Показано (В.Г. Артюхов, М.С. Трубицына, М.А. Наквасина и др., 2011), что УФ-свет (151, 1510, 3020 Дж/м²) инициирует апоптоз лимфоцитов, инициируя фотохимические превращения компонентов клетки. Кроме того, после воздействия УФ-света в смеси лимфоцитов возможна активация Fas-L, индуцирующая апоптоз иммунных клеток (R. Caricchio, E.A. Reap, P.L. Cohen, 1998). Эти процессы приводят к запуску каспазного каскада и активации каспазы-3. Повышение уровня сурвивина через 24 ч. инкубации отражает адаптационные возможности лимфоцитов и свидетельствует о поддержании их функциональной активности.

Глава 6. ИССЛЕДОВАНИЕ КОМПЛЕКСНОГО ВОЗДЕЙСТВИЯ
МОНООКСИДА УГЛЕРОДА И УФ-СВЕТА
НА ЛИМФОЦИТЫ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА

6.1. Исследование комплексного воздействия монооксида углерода
(60, 75 и 90 мин.) и УФ-света (151, 453 и 755 Дж/м²)
на уровень экспрессии CD95 рецепторов лимфоцитов крови человека
методом проточной цитофлуориметрии

Влияние УФ-света в дозе 151 Дж/м² на лимфоциты, инкубированные с СО в течение 60 мин., проявлялось в возрастании уровня экспрессии CD95-маркеров иммунокомпетентных клеток на 21,5% по сравнению с аналогичными образцами без облучения. В случае инкубации лимфоцитов в атмосфере монооксида углерода в течение 75 и 90 мин. обнаружить статистически значимые изменения анализируемого показателя у фотомодифицированных в дозе 151 Дж/м² клеток (по сравнению с аналогичными образцами без облучения) не удалось (Рис. 40, 41).

В условиях сочетанного воздействия монооксида углерода в течение 60 и 75 мин. и УФ-света в дозе 453 Дж/м² уровень экспрессии CD95-антигенов лимфоцитов по сравнению с контролем в первом случае увеличивался на 21,8% , во втором – уменьшался на 19,0%.

В образцах, модифицированных воздействием СО в течение 90 мин., УФ-свет в дозе 755 Дж/м² индуцировал увеличение СИФ CD95⁺-клеток относительно необлученного образца на 5,9%. В остальных случаях статистически значимых отклонений исследуемого параметра выявлено не было.

Таким образом, комплексное воздействие монооксида углерода (60, 75 и 90 мин.) и УФ-света (151, 453 и 755 Дж/м²) на иммуноциты доноров способствует разновекторным изменениям величины средней интенсивности флуоресценции CD95 рецепторов на поверхности их мембран.

Рис. 40. Величины средней интенсивности флуоресценции CD95 маркеров на поверхности лимфоцитов крови человека, модифицированных монооксидом углерода и УФ-светом: 1 – образцы без облучения; 2 – 151 Дж/м²; 3 – 453 Дж/м²; 4 – 755 Дж/м²

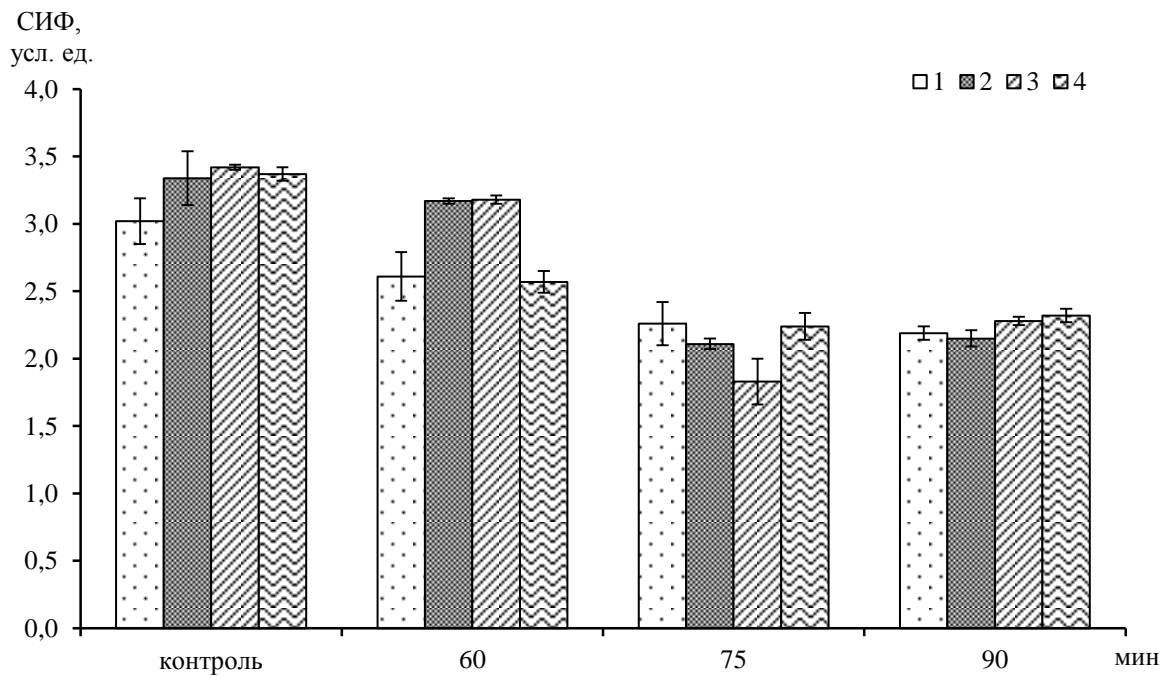
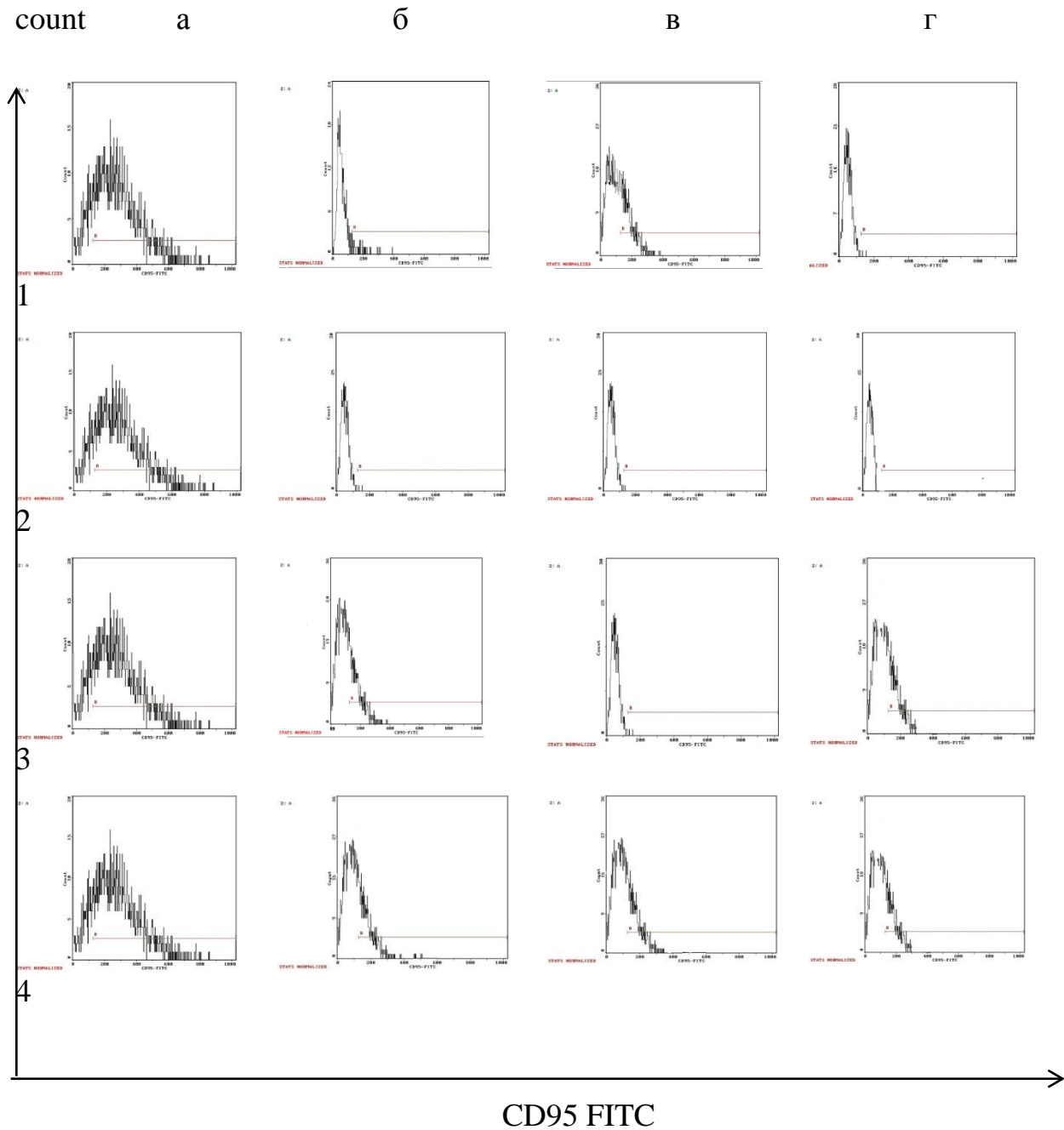


Рис. 41. Однопараметрические гистрограммы изменения уровня экспрессии CD95-маркеров на поверхности лимфоцитов крови человека, модифицированных монооксидом углерода и УФ-светом (специфическое окрашивание клеток, с которыми связывается значительное количество FITC-меченных антител к CD95), а – контрольные образцы; б, в, г – СО-модифицированные соответственно 60, 75, 90 мин. образцы; 1 – без облучения; 2 – 151 Дж/м²; 3 – 453 Дж/м²; 4 – 755 Дж/м².



6.2. Исследование комплексного воздействия монооксида углерода (60, 75 и 90 мин.) и УФ-света (151, 453 и 755 Дж/м²) на структурное состояние ДНК лимфоцитов крови человека методом электрофореза в агарозном геле до и после их суточного термостатирования

После воздействия УФ-излучения во всех используемых дозах (151, 453 и 755 Дж/м²) на СО-модифицированные лимфоциты (60, 75 и 90 мин.) ЭФП молекулы ДНК составила 1,30 см (Рис. 42, 44, 46). Сочетанное действие монооксида углерода (60, 75 и 90 мин.) и УФ-света (151, 453 и 755 Дж/м²) не приводило к изменению ЭФП через 24 ч. термостатирования (Рис. 43, 45, 47).

Рис. 42. Электрофореграмма ДНК лимфоцитов, модифицированных СО в течение 60 мин. (1) и УФ-светом в дозах 151, 453 и 755 Дж/м² (2, 3 и 4 дорожки соответственно)

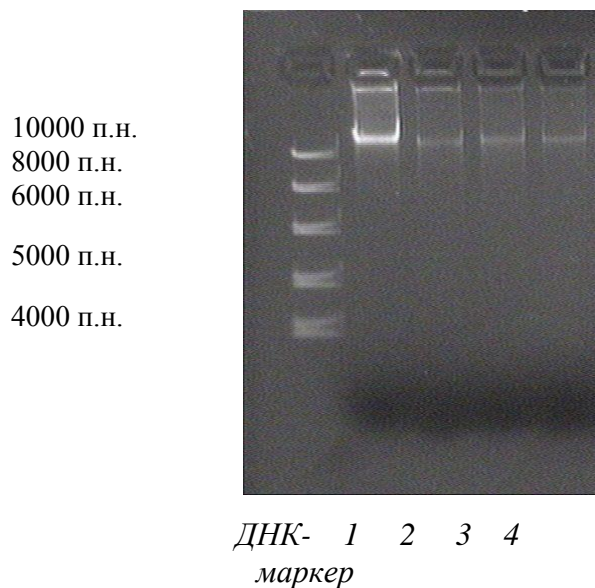


Рис. 43. Электрофореграмма ДНК лимфоцитов, модифицированных СО в течение 60 мин. (1) и УФ-светом в дозах 151, 453 и 755 Дж/м² (2, 3 и 4 дорожки соответственно) после суточного термостатирования

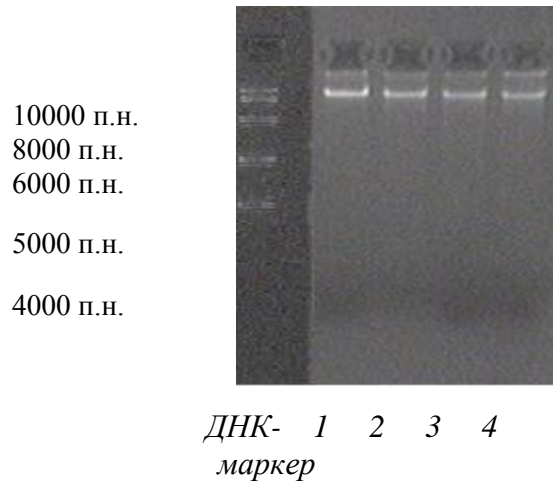


Рис. 44. Электрофореграмма ДНК лимфоцитов, модифицированных СО в течение 75 мин. (1) и УФ-светом в дозах 151, 453 и 755 Дж/м² (2, 3 и 4 дорожки соответственно)

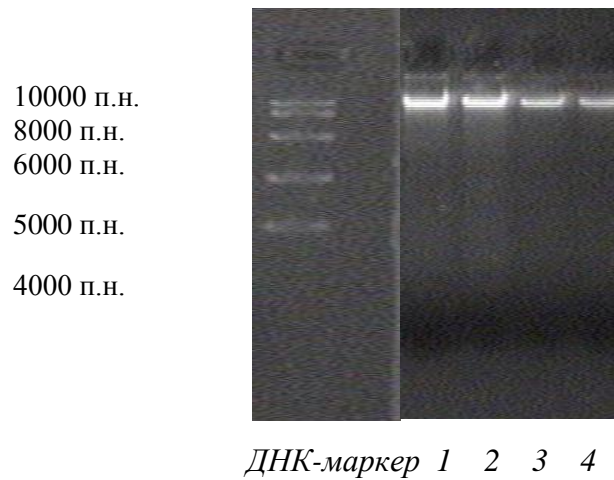


Рис. 45. Электрофореграмма ДНК лимфоцитов, модифицированных СО в течение 75 мин. (1) и УФ-светом в дозах 151, 453 и 755 Дж/м² (2, 3 и 4 дорожки соответственно) после суточного термостатирования

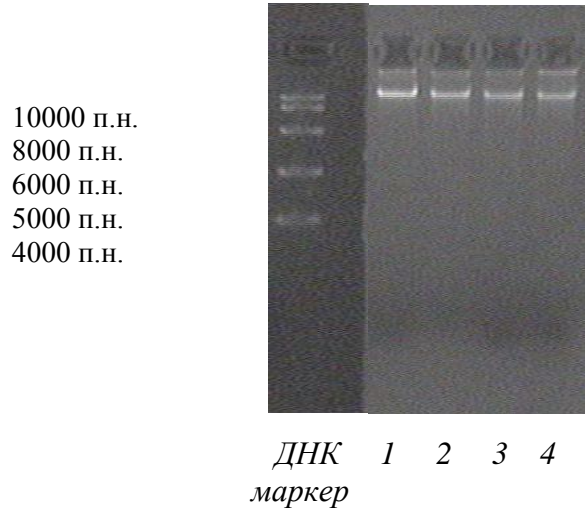


Рис. 46. Электрофореграмма ДНК лимфоцитов, модифицированных СО в течение 90 мин. (1) и УФ-светом в дозах 151, 453 и 755 Дж/м² (2, 3 и 4 дорожки соответственно)

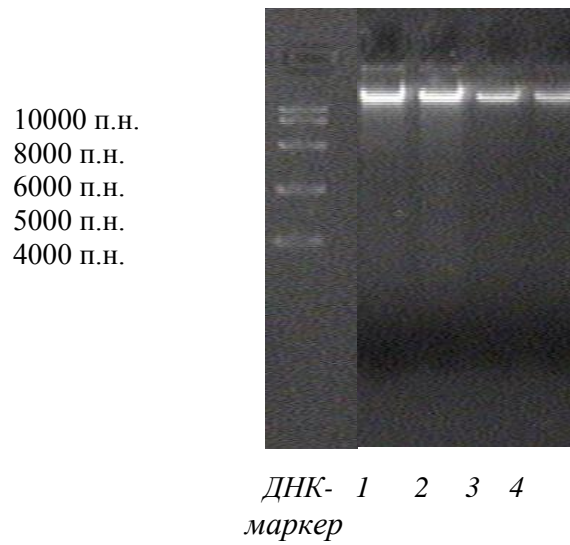
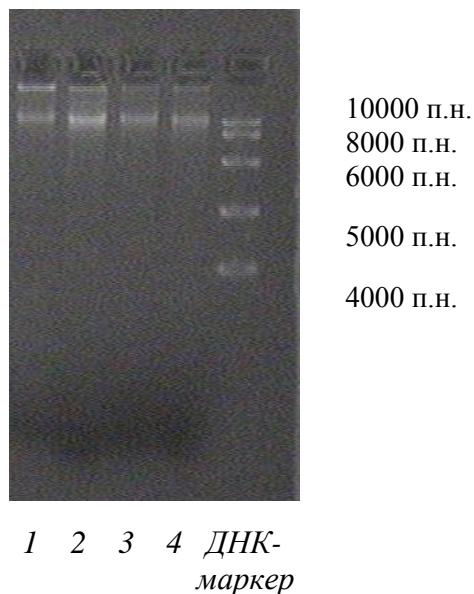


Рис. 47. Электрофореграмма ДНК лимфоцитов, модифицированных СО в течение 90 мин. (1) и УФ-светом в дозах 151, 453 и 755 Дж/м² (2, 3 и 4 дорожки соответственно) после суточного термостатирования



В результате анализа информации, полученной при помощи метода электрофореза в агарозном геле молекул ДНК лимфоцитов крови человека в условиях сочетанного действия монооксида углерода (60, 75 и 90 мин.) и УФ-света (151, 453, 755 Дж/м²) не выявлено изменения ЭФП и фрагментации молекулы ДНК. Это указывает на блокирование развития процессов программируемой гибели лимфоцитов в данных условиях.

6.3. Исследование люминолзависимой биохемилюминесценции лимфоцитов крови человека после комплексного воздействия монооксида углерода (60, 75 и 90 мин.) и УФ-света (151, 453 и 755 Дж/м²) до и после их суточного термостатирования

Облучение инкубированных в течение 60 мин. с СО иммуноцитов в дозах 151 и 453 Дж/м² не приводило к статистически значимым изменениям интенсивности хемилюминесценции. УФ-воздействие в дозе 755 Дж/м² способствовало возрастанию параметра I_{max} на 52,2% по сравнению с образцами, не подвергшимися воздействию УФ-света (Табл. 6).

Таблица 6. Величины максимальной интенсивности биохемилюминесценции (I_{max}) лимфоцитов крови человека после комплексного воздействия монооксида углерода (60, 75 и 90 мин.) и УФ-света (151, 453 и 755 Дж/м²) до и после их суточного термостатирования

Условия эксперимента	I_{max} , мВ	I_{max} , мВ через 24 ч.
60 мин СО	4,6±0,4	6,7±0,6
60 мин.СО+151 Дж/м ²	5,3±0,9	7,7±0,6**
60 мин.СО+453 Дж/м ²	5,3±0,7	9,0±0,9**
60 мин.СО+755 Дж/м ²	7,0±0,7*	14,0±2,1**
75 мин.СО	7,5±0,4	14,7±1,5
75 мин.СО+151 Дж/м ²	5,5±0,8*	15,0±2,0**
75 мин.СО+453 Дж/м ²	6,3±0,8	15,7±0,6**
75 мин.СО+755 Дж/м ²	6,5±1,0	12,3±2,5**
90 мин. СО	5,5±0,4	15,0±0,9
90 мин.СО+151 Дж/м ²	4,2±0,7*	15,0±0,9**
90 мин.СО+453 Дж/м ²	5,4±0,4	16,3±3,0**
90 мин.СО+755 Дж/м ²	7,2±0,7*	14,0±3,5**

*-отклонения исследуемого показателя статистически значимы относительно соответствующего значения без облучения;

** -отклонения исследуемого показателя статистически значимы относительно соответствующего значения без 24 ч. термостатирования.

При анализе данных биохемилюминограммы иммуноцитов, инкубированных в атмосфере монооксида углерода в течение 75 мин. и в дальнейшем УФ-облученных в дозе 151 Дж/м², отмечалось снижение интенсивности хемилюминесценции на 26,7%. В случае воздействия УФ-света в больших дозах (453 и 755 Дж/м²) на инкубированные с СО в течение 75 мин. иммуноциты обнаружить статистически значимые изменения анализируемого показателя (по сравнению с аналогичным образцом без облучения) не удалось.

После пропускания через суспензию лимфоцитов монооксида углерода в течение 90 мин. и дальнейшего их облучения УФ-светом в дозе 151 Дж/м² выяв-

лено уменьшение параметра I_{max} исследуемых клеток на 23,6%, а в дозе 755 Дж/м² – его увеличение на 30,9% относительно значений необлученных образцов.

После суточного термостатирования СО-модифицированных в течение 60 мин. лимфоцитов с последующим УФ-облучением в дозах 151, 453 и 755 Дж/м² наблюдалось статистически значимое увеличение максимальной интенсивности хемилюминесценции на 43,9%; 68,9% и в 2 раза соответственно (до значений 7,7±0,6; 9,0±0,9; 14,0±2,1 мВ) по сравнению с аналогичными клетками без инкубации в термостате.

Воздействие УФ-светом (151, 453 и 755 Дж/м²) на иммуноциты, инкубированные с СО 75 мин., приводило к статистически значимому повышению исследуемого показателя люминограммы в 2,7; 2,5 и 1,9 раза (до значений 15,0±2,0; 15,7±0,6; 12,3±2,5 мВ) через 24 ч. относительно таких же образцов без суточного термостатирования.

Облучение в дозах 151, 453 и 755 Дж/м² инкубированных 90 мин. с монооксидом углерода иммунокомпетентных клеток способствовало возрастанию интенсивности хемилюминесценции через сутки в 3,5; 3,0 и 1,9 раза (до значений 15,0±0,9; 16,3±3,0; 14,0±3,5 мВ) соответственно по сравнению с образцами, не находящимися в течение 24 ч. в термостате.

Таким образом, УФ-свет (151, 453 и 755 Дж/м²) инициировал процессы ПФОЛ СО-модифицированных лимфоцитов (60, 75 и 90 мин.) крови человека через 24 ч. инкубирования в термостате, что выражалось в увеличении параметра I_{max} биохемилюминограммы.

Значение светосуммы хемилюминесценции лимфоцитов, инкубированных с СО в течение 60 мин. и УФ-облученных в дозах 453 и 755 Дж/м², увеличивалось до величин 25,7±4,4 и 21,0±4,4 мВ·с соответственно относительно аналогичных необлученных образцов (на 71,4% и 76,7%) (Табл. 7).

Воздействие УФ-света в дозе 151 Дж/м² на инкубированные с монооксидом углерода образцы в течение 75 мин. способствовало снижению параметра светосуммы хемилюминесценции на 47,4% относительно соответствующих образцов, не подвергнутых воздействию УФ-света.

Таблица 7. Величины светосуммы биохемиллюминесценции (S) лимфоцитов крови человека после комплексного воздействия монооксида углерода (60, 75 и 90 мин.) и УФ-света (151, 453 и 755 Дж/м²) до и после их суточного термостатирования

Условия эксперимента	S, мВ·с	S, мВ·с через 24 ч.
60 мин СО	9,0±2,7	21,3±0,4
60 мин.СО+151 Дж/м ²	12,5±4,8	3,0±0,4**
60 мин.СО+453 Дж/м ²	25,7±4,4*	19,7±1,6**
60 мин.СО+755 Дж/м ²	21,0±4,4*	28,0±0,6**
75 мин.СО	9,5±1,3	17,0±1,0
75 мин.СО+151 Дж/м ²	5,0±1,1*	5,0±1,2
75 мин.СО+453 Дж/м ²	8,6±3,1	11,0±0,6
75 мин.СО+755 Дж/м ²	4,3±2,0	17,7±1,9**
90 мин. СО	7,3±4,3	20,0±0,6
90 мин.СО+151 Дж/м ²	7,3±4,3	6,7±2,1
90 мин.СО+453 Дж/м ²	4,7±1,6	16,0±0,9**
90 мин.СО+755 Дж/м ²	6,3±2,1	16,0±2,6**

*-отклонения исследуемого показателя статистически значимы относительно соответствующего значения без облучения;

** -отклонения исследуемого показателя статистически значимы относительно соответствующего значения без 24 ч. термостатирования.

В остальных случаях статистически значимых изменений величины светосуммы хемиллюминесценции лимфоцитарных клеток выявить по сравнению с аналогичными образцами без облучения не удалось.

Суточная инкубация в термостате СО-модифицированных 60 мин. клеток с последующим облучением УФ-светом 151 и 453 Дж/м² приводила к статистически значимому снижению светосуммы хемиллюминесценции в 4,2; 1,3 раза соответственно относительно таких же образцов без 24 ч. инкубации. Воздействие УФ-света в дозе 755 Дж/м² на лимфоциты, инкубированные с монооксидом углерода в течение 60 мин., способствовало возрастанию

изучаемого показателя до значения $28,0 \pm 0,6$ мВ·с (на 33,3%) по сравнению с иммунocyтaми без 24 ч. нахождения их в термостате.

УФ-свет в дозе 755 Дж/м^2 индуцировал повышение светосуммы хемилюминесценции клеток, подвергшихся воздействию СО в течение 75 мин. в 4,1 раза по сравнению с такими же образцами без суточного хранения.

При анализе биохемилюминограммы иммунocyтoв, инкубированных в атмосфере монооксида углерода в течение 90 мин. и в дальнейшем УФ-облученных в дозах 453 и 755 Дж/м^2 , отмечалось увеличение светосуммы хемилюминесценции через 24 ч. в 3,4 и 2,5 раза соответственно относительно аналогичных образцов.

Таким образом, комплексное воздействие монооксида углерода и УФ-света на лимфоциты крови человека способствовало разнонаправленным изменениям параметров биохемилюминесценции. После суточного хранения исследуемых лимфоидных клеток в преобладающем большинстве случаев наблюдалось увеличение интенсивности хемилюминесценции и ее светосуммы, что указывает на усиление свободнорадикальных процессов и снижение антиоксидантной защиты лимфоцитов в наблюдаемых условиях.

6.4. Исследование активности сукцинатдегидрогеназы митохондрий лимфоцитов крови человека после комплексного воздействия монооксида углерода (60,75 и 90 мин.) и УФ-света ($151, 453$ и 755 Дж/м^2) до и после их суточного термостатирования

В условиях комплексного воздействия монооксида углерода в течение 60 мин. и УФ-света в дозах 151, 453 и 755 Дж/м^2 активность СДГ лимфоцитов по сравнению с аналогичными образцами без облучения статистически значимо уменьшалась до значений $5,0 \pm 0,2$; $4,2 \pm 0,4$; и $3,9 \pm 0,5$ мкмоль/л·мин (на 15,3%, 28,8% и 33,9%) соответственно (Табл. 8).

Воздействие УФ-света в дозах 453 и 755 Дж/м² на СО-модифицированные лимфоциты (75 мин.) приводило к статистически значимому снижению активности исследуемого фермента митохондрий до значений 8,0±0,4 и 7,1±0,4 мкмоль/л·мин (на 16,7% и 26,0%) по сравнению с соответствующими лимфоцитами без облучения.

Таблица 8. Ферментативная активность митохондриальной сукцинатдегидрогеназы лимфоцитов крови человека после комплексного воздействия монооксида углерода (60, 75 и 90 мин.) и УФ-света (151, 453 и 755 Дж/м²) до и после их суточного термостатирования

Условия эксперимента	Ферментативная активность СДГ, мкмоль/л·мин	Ферментативная активность СДГ через 24 ч., мкмоль/л·мин
60 мин СО	5,9±0,5	9,5±1,2
60 мин.СО+151 Дж/м ²	5,0±0,2*	12,1±0,7**
60 мин.СО+453 Дж/м ²	4,2±0,4*	11,9±0,3**
60 мин.СО+755 Дж/м ²	3,9±0,5*	13,3±0,5**
75 мин.СО	9,6±0,5	6,8±1,5
75 мин.СО+151 Дж/м ²	8,9±0,4	6,8±0,4**
75 мин.СО+453 Дж/м ²	8,0±0,4*	7,6±0,2
75 мин.СО+755 Дж/м ²	7,1±0,4*	7,7±0,2
90 мин.СО	7,6±0,7	5,8±1,6
90 мин.СО+151 Дж/м ²	7,1±0,3	6,6±0,2
90 мин.СО+453 Дж/м ²	7,0±0,4	6,9±0,2
90 мин.СО+755 Дж/м ²	6,6±0,5	7,8±0,5**

*-отклонения исследуемого показателя статистически значимы относительно соответствующего значения без облучения;

** -отклонения исследуемого показателя статистически значимы относительно соответствующего значения без 24 ч. термостатирования.

Сочетанное влияние монооксида углерода (90 мин.) и УФ-света (151, 453 и 755 Дж/м²) не вызывало значимых отличий от необлученных иммуноцитов.

Функциональная активность сукцинатдегидрогеназы лимфоцитов, инкубированных с СО в течение 60 мин. и УФ-облученных в дозах 151, 453 и 755 Дж/м²

увеличивалась в 2,4; 2,8 и 3,4 раза соответственно относительно аналогичных не-термостатированных в течение 24 ч. образцов.

Воздействие УФ-света в дозе 151 Дж/м² на СО-модифицированные 75 мин. лимфоциты приводило к статистически значимому снижению активности СДГ на 23,6%, относительно соответствующих образцов, не подвергнутых суточному термостатированию. Экспозиция лимфоидных клеток в течение 75 мин. и последующее облучение их в дозе 453 и 755 Дж/м² не выявили статистически значимых отклонений анализируемого показателя относительно аналогичных объектов без суточного хранения.

Облучение инкубированных 90 мин. с СО иммуноцитов в дозе 755 Дж/м² способствовало повышению активности СДГ на 18,2% по сравнению с образцами, не подвергшимися термостатированию. В остальных случаях статистически значимых отличий в активности фермента выявлено не было.

Таким образом, после УФ-облучения в дозах 151, 453 и 755 Дж/м² СО-модифицированных (60, 75 и 90 мин.) лимфоцитов крови человека наблюдалось в большинстве случаев падение функциональной активности СДГ. В связи с тем, что изучаемый фермент содержит сульфгидрильные группы –SH, одной из причин фотоинактивации его молекул может являться их окисление после воздействия УФ-света. Увеличение активности СДГ de novo после 24 ч. нахождения клеток в термостате, вероятно, связано с активацией процесса аэробного пути окисления глюкозы, что позволяет клеткам снизить ее потребление в энергетических целях и сохранить достаточный уровень запаса АТФ.

6.5. Исследование активности цитохром *c* оксидазы митохондрий лимфоцитов крови человека после комплексного воздействия монооксида углерода (60, 75 и 90 мин.) и УФ-света (151, 453 и 755 Дж/м²) до и после их суточного термостатирования

Сочетанное действие СО в течение 60 мин. и УФ-света в дозах 151, 453 и 755 Дж/м² приводило к статистически значимому уменьшению активности иссле-

дуемого фермента до значений $1,1 \pm 0,1$; $0,9 \pm 0,2$ и $0,8 \pm 0,1$ мкмоль/л·мин (на 21,4%; 35,7% и 42,9%) соответственно по сравнению с аналогичными образцами без облучения (Табл. 9).

Функциональная активность ЦО митохондрий лимфоидных клеток статистически значимо не изменялась после модификации УФ-светом ($151-755 \text{ Дж/м}^2$) и монооксидом углерода (75, 90 мин.) по сравнению с образцами, не подвергающимися облучению.

Функциональная активность цитохром *c* оксидазы лимфоцитов, инкубированных с СО в течение 60 мин. с последующим УФ-облучением в дозах 151, 453 и 755 Дж/м^2 статистически значимо не изменялась относительно аналогичных не-термостатированных образцов.

Таблица 9. Ферментативная активность митохондриальной цитохром *c* оксидазы лимфоцитов крови человека после комплексного воздействия монооксида углерода (60, 75 и 90 мин.) и УФ-света ($151, 453$ и 755 Дж/м^2) до и после их точного термостатирования

Условия эксперимента	Ферментативная активность ЦО, мкмоль/л·мин	Ферментативная активность ЦО через 24 ч., мкмоль/л·мин
60 мин СО	$1,4 \pm 0,1$	$1,4 \pm 0,3$
60 мин.СО+151 Дж/м ²	$1,1 \pm 0,1^*$	$1,5 \pm 0,3$
60 мин.СО+453 Дж/м ²	$0,9 \pm 0,2^*$	$1,4 \pm 0,3$
60 мин.СО+755 Дж/м ²	$0,8 \pm 0,1^*$	$0,9 \pm 0,1$
75 мин.СО	$1,5 \pm 0,2$	$1,8 \pm 0,2$
75 мин.СО+151 Дж/м ²	$1,5 \pm 0,2$	$1,6 \pm 0,1$
75 мин.СО+453 Дж/м ²	$1,1 \pm 0,2$	$1,7 \pm 0,2^{**}$
75 мин.СО+755 Дж/м ²	$1,3 \pm 0,4$	$1,8 \pm 0,3$
90 мин.СО	$1,6 \pm 0,1$	$1,9 \pm 0,1$
90 мин.СО+151 Дж/м ²	$1,9 \pm 0,2$	$1,7 \pm 0,2$
90 мин.СО+453 Дж/м ²	$1,4 \pm 0,3$	$1,5 \pm 0,4$
90 мин.СО+755 Дж/м ²	$1,3 \pm 0,3$	$1,4 \pm 0,4$

*-отклонения исследуемого показателя статистически значимы относительно соответствующего значения без облучения;

** -отклонения исследуемого показателя статистически значимы относительно соответствующего значения без 24 ч. термостатирования.

Воздействие УФ-света в дозе 453 Дж/м² на модифицированные с СО в течение 75 мин. лимфоциты приводило к статистически значимому повышению активности ЦО на 54,5% относительно соответствующих образцов без суточной инкубации. В остальных случаях значимых отличий анализируемого показателя обнаружено не было.

УФ-модификация в дозах 151, 453 и 755 Дж/м² лимфоцитов, инкубированных в атмосфере монооксида углерода в течение 90 мин. не выявила статистически значимых отклонений активности ЦО по сравнению с аналогичными нетермостатированными образцами.

Анализируя полученные данные, можно предположить, что УФ-свет в дозах 151, 453 и 755 Дж/м² способствовал уменьшению активности ЦО только у СО-модифицированных в течение 60 мин. иммуноцитов. Увеличение времени экспозиции клеток в атмосфере СО (75 и 90 мин.) не вызывало снижения активности исследуемого фермента при последующем УФ-облучении. Возможно, именно в это время запускаются процессы, способствующие поддержанию митохондриальной активности фермента.

6.6. Исследование содержания антиапоптозного белка Bcl-2 лимфоцитов крови человека после комплексного воздействия монооксида углерода (60, 75 и 90 мин.) и УФ-света (151, 453 и 755 Дж/м²) до и после их суточного термостатирования

У лимфоцитов, инкубированных в атмосфере СО в течение 60 мин., УФ-свет в дозах 151 и 453 Дж/м² понижал содержание белка до значений 11,8±0,9 и 5,7±2,0 нг/мл (на 29,3% и 65,9%) соответственно по сравнению с аналогичным образцом без облучения. УФ-свет в дозе 755 Дж/м² способствовал возрастанию экспрессии Bcl-2 до первоначальных значений, но статистически значимых отличий выявлено не было (Табл. 10).

Анализ результатов сочетанного действия монооксида углерода (75 мин.) и УФ-света в дозе 453 Дж/м² позволил выявить статистически значимые отклонения: количество изучаемого антиапоптозного белка в лизате лимфоцитов увеличивалось на 69,6% (до значения 19,0±1,2 нг/мл) относительно соответствующего необлученного образца.

УФ-свет в дозе 453 Дж/м² индуцировал повышение содержания белка Bcl-2 на 24,6% (19,2±0,8 нг/мл), а в дозе 755 Дж/м² – на 70,8% (26,3±2,7 нг/мл) у СО-модифицированных в течение 90 мин. образцов по сравнению с такими же образцами без воздействия УФ-света.

В остальных случаях статистически значимых отклонений содержания антиапоптозного белка Bcl-2 выявлено не было.

Таблица 10. Содержание антиапоптозного белка Bcl-2 лимфоцитов крови человека после комплексного воздействия монооксида углерода (60, 75 и 90 мин.) и УФ-света (151, 453 и 755 Дж/м²) до и после их суточного термостатирования

Условия эксперимента	Содержание Bcl-2, нг/мл	Содержание Bcl-2 через 24 ч., нг/мл
60 мин СО	16,7±0,7	16,1±0,1
60 мин.СО+151 Дж/м ²	11,8±0,9*	6,4±0,2**
60 мин.СО+453 Дж/м ²	5,7±2,0*	7,3±0,3**
60 мин.СО+755 Дж/м ²	17,8±0,3	3,4±0,2**
75 мин.СО	11,2±0,9	3,1±0,07
75 мин.СО+151 Дж/м ²	13,0±1,0	9,3±0,04**
75 мин.СО+453 Дж/м ²	19,0±1,2*	9,4±0,1**
75 мин.СО+755 Дж/м ²	12,2±2,4	4,3±0,4**
90 мин.СО	15,4±0,6	10,1±0,1
90 мин.СО+151 Дж/м ²	13,6±1,4	8,3±0,03**
90 мин.СО+453 Дж/м ²	19,2±0,8*	17,0±0,2**
90 мин.СО+755 Дж/м ²	26,3±2,7*	19,3±0,1**

*-отклонения исследуемого показателя статистически значимы относительно соответствующего значения без облучения;

** -отклонения исследуемого показателя статистически значимы относительно соответствующего значения без 24 ч. термостатирования.

Исследование сочетанного воздействия монооксида углерода (60 мин.) и УФ-света в дозах 151 и 755 Дж/м² через 24 ч. позволило выявить снижение экспрессии белка Vcl-2 на 45,8% и 80,9% (до значений 6,4±0,2 и 3,4±0,2 нг/мл) соответственно по сравнению с образцами без суточного хранения. Доза облучения 453 Дж/м² индуцировала повышение уровня экспрессии Vcl-2 на 40,4% (7,3±0,3 нг/мл) у термостатированных 24 ч. СО-модифицированных лимфоцитов (60 мин.) (по сравнению с клетками без суточного хранения).

Выявлено, что через сутки после УФ-облучения в дозах 151, 453 и 755 Дж/м² у СО-модифицированных (75 мин.) иммунокомпетентных клеток происходит статистически значимое уменьшение экспрессии белка на 28,5%, 50,5% и 64,8% соответственно относительно таких же образцов без суточного хранения в термостате.

Воздействие УФ-света в дозах 151, 453 и 755 Дж/м² на СО-модифицированные 90 мин. иммуноциты способствовало снижению содержания Vcl-2 на 38,9%, 11,5% и 26,6% соответственно по сравнению с такими же образцами без суточного хранения.

Выявлено, что УФ-облучение в дозах 151, 453 и 755 Дж/м² способствовало в преобладающем большинстве случаев увеличению экспрессии белка Vcl-2 в лизате СО-модифицированных (60, 75 и 90 мин.) лимфоидных клеток доноров. Согласно канал-формирующей гипотезе Р.Т. Brenner et al. (2000), Vcl-2 способен блокировать ион-проводящую активность адениновых нуклеотидов за счет встраивания в мембрану митохондрий, что препятствует повышению проницаемости их мембраны. Анализируя полученные нами данные, можно предположить, что монооксид углерода способствует поддержанию активности митохондрий и ферментов ЭТЦ в используемом нами диапазоне времени, воздействия на лимфоидные клетки (60, 75 и 90 мин.), что может быть следствием защитно-приспособительных реакций клеток, направленных на сохранение целостности митохондриальной мембраны. Однако сочетанное воздействие монооксида углерода (60, 75 и 90 мин.) и УФ-света (151, 453 и 755 Дж/м²) на лимфоциты крови человека через 24 ч. термостатирования приводило к снижению

содержания антиапоптозного белка, что указывает на преобладание процессов, способствующих индукции апоптоза.

6.7. Исследование содержания антиапоптозного белка сурвивина лимфоцитов крови человека после комплексного воздействия монооксида углерода (60, 75 и 90 мин.) и УФ-света (151, 453 и 755 Дж/м²) до и после их суточного термостатирования

УФ-свет в дозах 151, 453 и 755 Дж/м² увеличивал количество сурвивина в лизате СО-модифицированных лимфоцитов (60 мин.) в 1,9; 4,6 и в 3,0 раза (до значений 40,0±8,5; 97,0±4,2; 62,0±2,8 пкг/мл) относительно соответствующего образца без УФ-облучения (Табл. 11).

При анализе комплексного воздействия монооксида углерода (75 мин.) и УФ-света в дозах 151, 453 и 755 Дж/м² выявляется повышение исследуемого показателя на 80,9%; 49,2%; и 42,9% соответственно относительно аналогичного образца без облучения.

Экспозиция лимфоидных клеток в течение 90 мин. с оксидом углерода (II) и последующее УФ-облучение в дозах 151 и 755 Дж/м² также оказывало стимулирующее действие на анализируемый показатель (на 21,3% и 17,8% соответственно).

После суточного термостатирования СО-модифицированных лимфоцитов (60 мин.) УФ-свет в дозах 151, 453 и 755 Дж/м² вызывает повышение уровня сурвивина в лизате иммуноцитов в 3,6; 1,8 и 1,7 раза по сравнению с такими же образцами без нахождения в термостате в течение 24 ч.

УФ-свет в дозах 151, 453 и 755 Дж/м² индуцировал возрастание содержания белка сурвивина в лизате СО-модифицированных лимфоцитов (75 мин.) крови человека через 24 ч. на 25,4%; 86,7% и 44,4% соответственно относительно таких же образцов, не подвергнутых УФ-облучению.

Содержание сурвивина возрастало через 24 ч. термостатирования после комплексного воздействия СО (90 мин.) и УФ-света (453 Дж/м²) на 20,3% относи-

тельно соответствующего образца без облучения. В остальных случаях статистически значимых изменений с содержанием сурвивина обнаружено не было.

Таблица 11. Содержание антиапоптозного белка сурвивина лимфоцитов крови человека после комплексного воздействия монооксида углерода (60, 75 и 90 мин.) и УФ-света (151, 453 и 755 Дж/м²) до и после их суточного термостатирования

Условия эксперимента	Содержание сурвивина, пкг/мл	Содержание сурвивина через 24 ч., пкг/мл
60 мин СО	21,0±1,4	210,5±40,2
60 мин.СО+151 Дж/м ²	40,0±8,5*	142,5±34,3**
60 мин.СО+453 Дж/м ²	97,0±4,2*	175,0±68,6**
60 мин.СО+755 Дж/м ²	62,0±2,8*	103,0±2,0**
75 мин.СО	63,0±0,0	209,0±41,2
75 мин.СО+151 Дж/м ²	114,0±14,1*	143,0±5,9**
75 мин.СО+453 Дж/м ²	94,0±0,0*	175,5±30,4**
75 мин.СО+755 Дж/м ²	90,0±5,7*	130,0±19,6**
90 мин.СО	84,5±2,1	227,5±4,9
90 мин.СО+151 Дж/м ²	102,5±0,7*	103,5±2,9
90 мин.СО+453 Дж/м ²	86,0±0,1	103,5±1,0**
90 мин.СО+755 Дж/м ²	99,5±6,4*	105,5±10,8

*-отклонения исследуемого показателя статистически значимы относительно соответствующего значения без облучения;

** -отклонения исследуемого показателя статистически значимы относительно соответствующего значения без 24 ч. термостатирования.

Таким образом, в проведенной серии экспериментов мы наблюдали увеличение содержания сурвивина в лизате СО-модифицированных лимфоцитов (60, 75 и 90 мин.) после воздействия УФ-света во всех используемых нами дозах (151, 453 и 755 Дж/м²), а через 24 ч. данный эффект значительно усиливался.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

С помощью методов иммуноферментного анализа, проточной цитофлуориметрии, горизонтального электрофореза в агарозном геле, спектрофотометрирования, биохемилюминесцентного анализа и сканирующей электронной микроскопии нами исследовано одиночное и комплексное воздействие монооксида углерода (экспозиция в течение 60, 75 и 90 мин.) и УФ-света (151, 453 и 755 Дж/м²) на структурно-функциональное состояние, метаболическую активность, уровень энергообеспеченности лимфоцитов и эритроцитов крови человека.

Так, было выявлено, что при экспозиции лимфоцитов в атмосфере монооксида углерода в течение 60, 75 и 90 мин. наблюдается снижение уровня экспрессии CD95 маркеров на поверхности лимфоцитов крови человека, что может свидетельствовать об антиапоптотическом потенциале исследуемого газового мессенджера. Дизрегуляция рецепторного пути апоптоза, по-видимому, связана с активированием MAP-киназой ERK транскрипционных факторов, что обуславливает выживание клеток после воздействия экзогенного CO.

Методом электрофореза в агарозном геле не выявлено «апоптотической лестницы» молекулы ДНК, что является аргументом в пользу представлений об отсутствии развития процессов программируемой клеточной гибели лимфоидных клеток после инкубации их в атмосфере оксида углерода (II).

Установлено, что монооксид углерода снижает уровень люминолзависимой хемилюминесценции, что свидетельствует об ослаблении процессов ПОЛ и образования АФК и, следовательно, об уменьшении вероятности развития клеточной смерти по пути апоптоза.

При экспозиции (75 мин.) клеток в атмосфере оксида углерода (II) зарегистрировано повышение активности сукцинатдегидрогеназы митохондрий лимфоцитов человека, что может быть связано с синтезом фермента *de novo*.

Основными мишенями монооксида углерода в клетке являются гемсодержащие соединения: связывание с активным центром гуанилатциклазы способствует последующему образованию из ГТФ цГМФ, активации цГМФ-зависимой протеинкиназы G с последующим фосфорилированием ее белковых субстратов.

Возможно, CO препятствует деполяризации и пермеабиллизации митохондриальных мембран, предотвращая выход в цитозоль апоптозиндуцирующих факторов. Это может достигаться путем включения антиапоптозных белков семейства Bcl-2 и IAP в компенсаторный механизм защиты клетки от гибели (В.А Коржов, А.В. Видмаченко, 2010; C.S. Queiroga, A.S. Almeida, P.M. Alves, 2011; М. Adamas, 2003; Т. Dragovich, С.М. Rudin, С.В. Thompson, 1998; Р.С. Kam, N.I. Ferch, 2000).

Обнаружено, что монооксид углерода (время инкубации 60 и 90 мин.) приводит к возрастанию содержания белков Bcl-2 и сурвивина (время экспозиции 90 мин.). Модификация клеток в атмосфере CO в присутствии проапоптозного цитокина (рекомбинантного интерлейкина-2) выявила статистически значимое увеличение содержания белка Bcl-2 с одновременным понижением содержания белка сурвивина. Выявленные результаты указывают на ведущую роль CO как вторичного мессенджера в дизрегуляции апоптоза лимфоцитов за счет вовлечения в данный процесс белка Bcl-2, что указывает на его роль в подавлении развития апоптоза по митохондриальному пути. Инкубирование лимфоцитов крови человека в течение 24 ч. в питательной среде RPMI-1640 приводит к более выраженной продукции белка сурвивина, и, как следствие, к блокаде каспаз-3 и -9, способствующих реализации программы смерти клеток. В результате этого иммунциты не гибнут по пути апоптоза, что подтверждается отсутствием разрывов в молекуле ДНК CO-модифицированных (60, 75 и 90 мин.) лимфоцитов крови человека через 24 ч. инкубирования.

При помощи метода электронной сканирующей микроскопии выявлено увеличение числа эритроцитов с множественными выростами, клеток «в виде спущенного мяча» после их предварительной экспозиции в атмосфере оксида углерода (II). По-видимому, изменения поверхностной архитектоники эритроцитов крови связано с уменьшением энергетического потенциала клеток, что отражается в резком снижении величины коэффициента баланса энергетических реакций.

Выявлено, что монооксид углерода (экспозиция 60 мин.) индуцирует возрастание активности глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы эритроцитарных клеток, однако, через 75 мин. инкубации в атмосфере CO наблюдается сдвиг в катаболиз-

ме глюкозы, что, в свою очередь, может способствовать структурному изменению мембраны эритроцитов.

Установлено, что УФ-свет в терапевтическом диапазоне доз (151, 453 и 755 Дж/м²) вызывает дозозависимое повышение параметров биохемилюминесценции (интенсивности и светосуммы хемилюминесценции), что свидетельствует об интенсификации процессов ПОЛ лимфоцитов крови человека.

С помощью проточной цитофлуориметрии показано, что УФ-свет (240 – 390 нм) проявляет проапоптотический эффект: возрастает количество CD95 маркеров на мембране лимфоцитов. Основным механизмом фотоиндуцированных изменений экспрессии изучаемого антигена на поверхности иммуноцитов является его синтез de novo; возможно также открытие предшествующих антигенных структур, локализованных в толще липидного бислоя (экстернализация) и конформационные перестройки, вызывающие их переориентировку в мембране.

УФ-свет в используемом диапазоне доз не приводит к формированию разрывов в молекуле ДНК, а вызывает модификацию входящих в ее состав компонентов – наблюдается «утяжеление» фрагментов геномной ДНК, и, как следствие, увеличение электрофоретической подвижности изучаемой макромолекулы по сравнению с контролем.

Выявлено, что УФ-свет (151, 453 и 755 Дж/м²) вызывает изменения метаболизма лимфоцитов крови человека: наблюдается уменьшение функциональной активности митохондриальных ферментов: сукцинатдегидрогеназы и цитохром с оксидазы.

Инкубация УФ-облученных лимфоцитов в течение 24 ч. приводит к повышению активности сукцинатдегидрогеназы и снижению активности цитохром с оксидазы, что указывает на доминирование аэробного пути окисления глюкозы: это позволяет клеткам снизить ее потребление, сохраняя необходимый уровень запаса АТФ.

УФ-свет в дозе 755 Дж/м² повышает содержание белка Bcl-2 через 24 ч. после прекращения облучения, что дает основание расценивать это как возможную

стадию инициации апоптоза и вовлечение в данный процесс антиапоптозного белка как компенсаторно-приспособительного фактора.

Нами выявлено уменьшение содержания белка сурвивина в УФ-модифицируемых клетках и статистически значимое его увеличение через 24 ч. инкубации.

Комплексное воздействие монооксида углерода и УФ-света (151, 453 и 755 Дж/м²) на лимфоциты крови человека проявляется в разновекторном изменении средней интенсивности флуоресценции CD95 рецепторов на поверхности их мембран.

Обнаружено увеличение через 24 ч. инкубирования интенсивности хемилюминесценции и светосуммы лимфоидных клеток после комплексного воздействия СО и УФ-света, что свидетельствует об усилении свободнорадикальных процессов в клетке и снижении антиоксидантной защиты лимфоцитов.

УФ-свет (151, 453 и 755 Дж/м²) способствовал в большинстве случаев увеличению содержания белков Vcl-2 и сурвивина СО-модифицированных лимфоцитов (время экспозиции 60, 75 и 90 мин.) и усилению данного эффекта через 24 ч. инкубирования клеток.

Таким образом, регистрируемые нами изменения показателей вносят существенный вклад в реализацию программируемой клеточной гибели лимфоцитов крови человека в условиях одиночного и сочетанного действия монооксида углерода (время экспозиции 60, 75 и 90 мин.) и УФ-света (151, 453 и 755 Дж/м²).

На основании результатов проведенных экспериментов и данных литературы предложены схемы процессов, протекающих при действии монооксида углерода (схема 1) и УФ-света (схема 2) на лимфоциты и эритроциты крови человека.

Схема 1. Молекулярно-клеточные механизмы действия монооксида углерода на лимфоциты и эритроциты крови человека по данным литературы (пунктирная линия) и результатам собственных исследований (жирная линия)

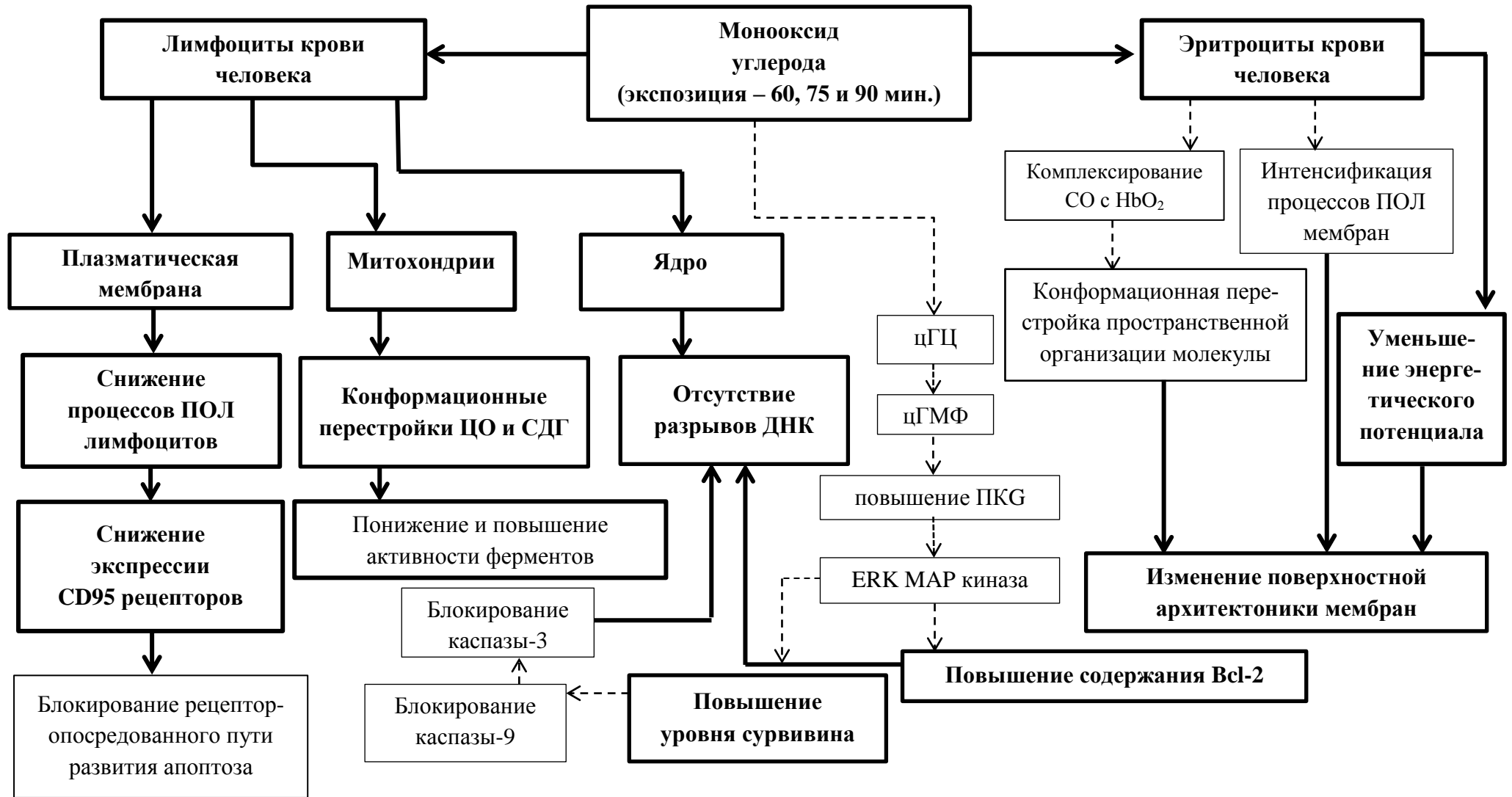
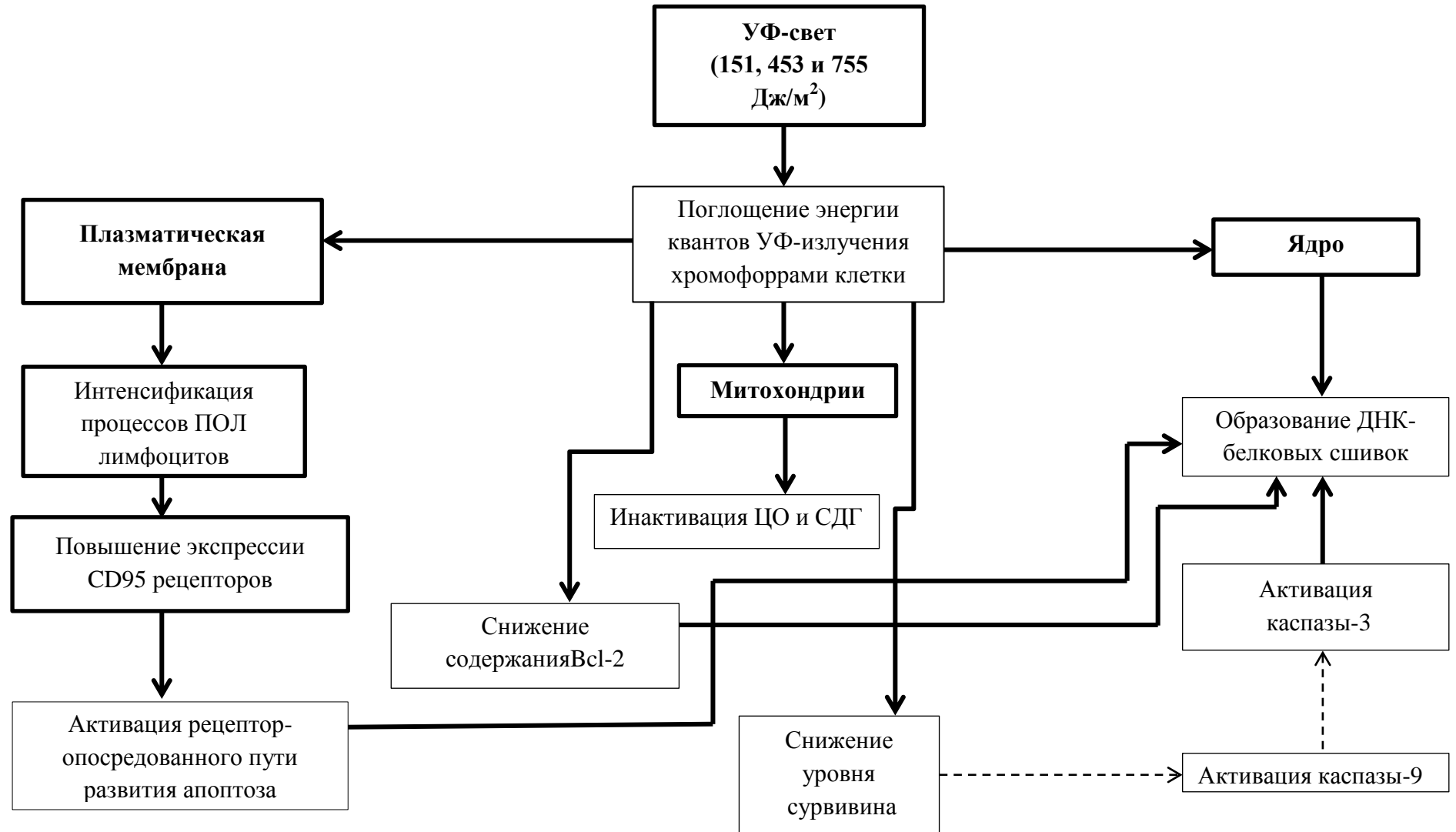


Схема 2. Молекулярно-клеточные механизмы действия УФ-излучения на лимфоциты крови человека по данным литературы (пунктирная линия) и результатам собственных исследований (жирная линия)



Список обозначений к схемам 1 и 2:

ПОЛ – пероксидное окисление липидов;

ЦО – цитохром *c* оксидаза;

СДГ – сукцинатдегидрогеназа;

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота;

цГЦ – циклическая гуанилатциклаза;

цГМФ – циклический гуанозинмонофосфат;

ПКГ – протеинкиназа G;

ERK MAP киназа – extracellular signal-regulated mitogen-activated protein kinase
(внеклеточная сигнал-регулирующая митоген-активирующая киназа);

СО – монооксид углерода;

НвО₂ – оксигемоглобин;

ВЫВОДЫ

1. В результате воздействия на смесь лимфоцитов монооксида углерода (время экспозиции 60, 75 и 90 мин.) выявляется снижение уровня экспрессии CD95 маркеров, параметров биохемилюминесценции, отсутствие фрагментации молекулы ДНК.
2. Установлено, что при инкубации клеток в атмосфере CO (60, 75 и 90 мин.) в присутствии рекомбинантного интерлейкина-2 происходит повышение содержания антиапоптозного белка Bcl-2 с одновременным уменьшением содержания белка сурвивина, что указывает на вовлечение в процесс дизрегуляции апоптоза белка Bcl-2.
3. Монооксид углерода (время инкубации – 60, 75 и 90 мин.) не оказывал влияния на функциональную активность митохондриальных ферментов – сукцинатдегидрогеназы и цитохром *c* оксидазы, а, возможно, способствовал конформационным перестройкам их молекул.
4. Оксид углерода (II) (время экспозиции – 75 и 90 мин.) вызывает гетерогенные изменения поверхностной архитектоники в популяции эритроцитов: увеличивается индекс трансформации клеток, появляется большое количество обратимо деформированных клеток, снижается доля дискоцитов.
5. Показано, что в ходе инкубации в атмосфере CO (время инкубации – 60, 75 и 90 мин.) наблюдается снижение энергетического потенциала эритроцитов крови человека.
6. Облучение лимфоцитов УФ-светом в дозах 151, 453, 755 Дж/м² (240 – 390 нм) вызывает дозозависимое увеличение спонтанной люминолзависимой хемилюминесценции и уровня экспрессии CD95 маркеров на поверхности мембран лимфоцитов крови человека.
7. Установлено увеличение электрофоретической подвижности молекул ДНК лимфоцитов крови человека после воздействия УФ-света в дозах 151, 453 и 755 Дж/м² по сравнению с контрольными образцами.

8. Воздействие УФ-света в дозах 151, 453, 755 Дж/м² вызывает фотоинактивацию сукцинатдегидрогеназы и цитохром *c* оксидазы, что свидетельствует о снижении энергообеспечения лимфоцитов крови человека.
9. Суточное инкубирование в термостате УФ-модифицированных (151, 453 и 755 Дж/м²) клеток приводило к повышению активности сукцинатдегидрогеназы и одновременному понижению активности цитохром *c* оксидазы УФ-облученных лимфоцитов (453 и 755 Дж/м²), что указывает на преобладание аэробного пути окисления глюкозы.
10. УФ-свет в дозе 755 Дж/м² способствует инициации процесса программируемой клеточной гибели лимфоцитов, на что указывает повышение содержания антиапоптозного белка Bcl-2 (на 21,3%) после 24 ч. инкубирования клеток.
11. УФ-свет в дозах 151, 453 и 755 Дж/м² приводит к фотоинактивации сукцинатдегидрогеназы СО-модифицированных (время инкубации – 60, 75 и 90 мин.) иммуноцитов.
12. УФ-свет в дозах 453 и 755 Дж/м² способствовал увеличению содержания белка Bcl-2 СО-модифицированных (время экспозиции – 60, 75 и 90 мин.) лимфоидных клеток, а через 24 ч. наблюдалось уменьшение уровня изучаемого антиапоптозного белка (при СО-модификации 60, 75 и 90 мин. и УФ-облучения 151, 453 и 755 Дж/м²).
13. Выявлено повышение содержания белка сурвивина СО-модифицируемых (время экспозиции – 60, 75 и 90 мин.) лимфоцитов после воздействия УФ-облучения в дозах 151, 453 и 755 Дж/м² и усиление этого эффекта через 24 ч. инкубирования иммуноцитов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Анализ влияния человеческого лейкоцитарного интерферона- α на экспрессию некоторых CD-молекул Т-лимфоцитами / В.Г. Артюхов [и др.] // Радиационная биология. Радиоэкология. – 2011. – Т. 51, № 2. – С. 258–263.
2. Артюхов В.Г. Биологические мембраны: структурная организация, функции, модификация физико-химическими агентами / В.Г. Артюхов, М.А. Наквасина. – Воронеж : Изд-во ВГУ, 2000. – 296 с.
3. Артюхов В.Г. Биофизика / В.Г. Артюхов, Т.А. Ковалева, В.П. Шмелев. – Воронеж : Изд-во ВГУ, 1994. – 336 с.
4. Артюхов В.Г. Влияние ультрафиолетового излучения на структурно-функциональное состояние Т- и В-лимфоцитов крови человека / В.Г. Артюхов, О.В. Путинцева, Е.В. Дмитриев // Радиационная биология. Радиоэкология. – 2003. – № 1. – С. 82–86.
5. Артюхов В.Г. Структурно-функциональное состояние биомембран и межклеточные взаимодействия / В.Г. Артюхов, М.А. Наквасина // Воронеж : ВГУ, 2008. – 155 с.
6. Барышников А.Ю. Иммунологические проблемы апоптоза / А.Ю. Барышников, Ю.В. Шишкин. – Москва : Эдиториал УРСС, 2002. – 320 с.
7. Башарина О.В. Защитное действие аутологичной плазмы от развития окислительного стресса в УФ-облученных лимфоцитах крови доноров / О.В. Башарина, О.В. Земченкова, В.Г. Артюхов // Радиационная биология. Радиоэкология. – 2012. – Т. 52, № 5. – С. 1–7.
8. Белки семейства V α 1-2 – молекулярные мишени проапоптотического действия ИЛ-2 и ИЛ-4 / О.Е. Чечина [и др.] // Иммунология. – 2011. – Т. 32, № 3. – С. 127–130.
9. Биологическое окисление / под ред. А.А. Терентьева. – Москва : РГМУ, 2012. – 73 с.
10. Биофизика / В.Г. Артюхов [и др.]. – Москва : Академический Проект, 2009. – 294 с.

11. Биофизика клеточных процессов : в 2 кн. / А.Б. Рубин. – Москва : Высшая школа, 1987. – Кн. 2. – 296 с.
12. Биохимия / под ред. Е.С. Северина. – Москва : ГЭОТАР-Медиа, 2004. – 779 с.
13. Вершигора А.Е. Общая иммунология / А.Е. Вершигора. – Киев : Высшая школа, 1990. – 736 с.
14. Владимиров Ю.А. Биохемилюминесценция / Ю.А. Владимиров. – Москва : Наука, 2000. – 432 с.
15. Влияние рекомбинантных форм интерлейкинов-5, -3 и эотоксина на апоптоз эозинофильных гранулоцитов / Н.В. Рязанцева [и др.] // Бюллетень экспериментальной биологии. – 2007. – Т. 143, № 4. – С. 370–373.
16. Влияние УФ-света на уровень экспрессии CD25 и продукцию интерлейкина-2 в лимфоцитах крови доноров / В.Г. Артюхов [и др.] // Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. – 2013. – № 7. – С. 48–53.
17. Внутриклеточные газовые посредники оксид азота, монооксид углерода и сульфид водорода участвуют в регуляции апоптоза / Н.В. Рязанцева [и др.] // Цитология. – 2012. – Т. 54, № 2. – С. 105–111.
18. Внутриклеточный окислительный стресс и апоптоз / Н.К. Зенков [и др.] // Успехи современной биологии. – 1999. – Т. 119, № 5. – С. 440–450.
19. Волгарева Е.В. Влияние УФ-облучения и УФ-облученной аутокрови на функциональное состояние лимфоцитов периферической крови человека / Е.В. Волгарева, А.П. Волгарев, К.А. Самойлова // Цитология. – 1990. – Т. 32, № 12. – С. 1217–1224.
20. Ганелина И.Е. Механизмы влияния облученной ультрафиолетовыми лучами крови на организм человека и животных / И.Е. Ганелина, К.А. Самойлова. – Ленинград : Наука, 1986. – 37 с.
21. Глинка Н.Л. Общая химия / Н.Л. Глинка. – Москва : Мир, 1990. – 372 с.
22. Грандберг И.И. Органическая химия / И.И. Грандберг. – Москва : Дрофа, 2002. – 672 с.
23. Дранник Г.Н. Клиническая иммунология и аллергология / Г.Н. Дранник. – Москва : МИА, 2003. – 604 с.

24. Дубинина Е.Е. Роль активных форм кислорода в качестве сигнальных молекул в метаболизме тканей при состояниях окислительного стресса / Е.Е. Дубинина // Вопросы медицинской химии. – 2001. – Т. 47, № 6. – С. 561–581.
25. Дубова С.М. Анализ действия УФ-излучения и некоторых индукторов интерферона на состояние Т-лимфоцитов крови человека: автореф. дис. на соискание степени канд. биол. наук / С.М. Дубова. – Воронеж : ВГУ, 2010. – 24 с.
26. Дубова С.М. О механизме модулирующего действия УФ-света на состояние антигенного профиля мембран Т-лимфоцитов крови человека / С.М. Дубова, О.В. Путинцева, В.Г. Артюхов // Вестник ВГУ. Серия : Химия. Биология. Фармация. – 2010. – № 1. – С.76–81.
27. Загоскин П.П. Новые данные о физиологической роли монооксида углерода / П.П. Загоскин // Нижегородский Медицинский Журнал. – 2008. – № 3. – С. 103–110.
28. Зайнулин В.Г. Роль апоптоза в возрастных патологиях / В.Г. Зайнулин, А.А. Москалев // Онтогенез. – 2001. – Т. 32, № 4. – С. 245–251.
29. Изменение уровня экспрессии CD2-рецепторов Т-лимфоцитами крови человека под действием УФ-света / В.Г. Артюхов [и др.] / Иммунология. – 2012.– Т. 33, № 1. – С. 6–10.
30. Изменение уровня экспрессии ряда поверхностных молекул лимфоцитов крови человека в условиях УФ-облучения их суспензий / В.Г. Артюхов [и др.] // Медицинская иммунология. – 2013. – № 4. – С. 361–368.
31. Иммунология : в 3-х т. / под ред. У. Пола. – Москва : Мир, 1988. – Т. 1. – 503 с.
32. Калетина М.И. Токсикологическая химия. Метаболизм и анализ токсикантов / М.И. Калетина. – Москва : ГЭОТАР-Медиа, 2008. – 760 с.
33. Клиорин А.И. Функциональная неравнозначность эритроцитов / А.И. Клиорин, Л.А. Тиунов. – Ленинград : Наука, 1974. – 147 с.
34. Козинец Г.И. Поверхностная архитектоника клеток периферической крови в норме и при заболеваниях системы крови / Г.И. Козинец, Ю.А. Симоврат. – Таллин : Валгус, 1984. – 113 с.

35. Коржов В.И. Монооксид углерода (обзор литературы) / В.И. Коржов, А.В. Видмаченко, М.В. Коржов // Журнал АМН Украины. – 2010. – Т. 16, № 1. – С. 23–37.
36. Кочетов Г.А. Практическое руководство по энзимологии / Г.А. Кочетов. – Москва : Высшая школа, 1980. – 271 с.
37. Кустов В.В. Токсикологическая характеристика искусственной атмосферы замкнутых экологических систем / В.В. Кустов, Л.А. Тиунов. – Москва : ВИНТИ, 1971. – 129 с.
38. Кэтти Д. Антитела. Методы : в 2 кн. – Москва : Мир, 1991. – Кн. 2. – 380 с.
39. Лаврик И.Н. Регуляция апоптоза, индуцированного через CD95/Fas и другие «рецепторы смерти» / И.Н. Лаврик // Молекулярная биология. – 2011. – Т. 45, № 1. – С. 173–179.
40. Лакомая Ю.А. Изучение свойств ферментов в эритроцитах напряженного эритропоэза / Ю.А. Лакомая, М.В. Колосова, Н.М. Титова // Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова. – 2004. – № 8. – С. 139.
41. Левтов В.А. Реология крови / В.А. Левтов, С.А. Регирер. – Москва, 1982. – 272 с.
42. Лонская И.А. Индукция и подавление апоптоза в тимоцитах крысы ультрафиолетовым облучением / И.А. Лонская, В.Н. Афанасьев, В.А. Печатников // Биофизика. – 1997. – Т. 42, Вып. 3. – С. 680–685.
43. Марков Х.М. Окись азота и окись углерода – новый класс сигнальных молекул / Х.М. Марков // Успехи физиологических наук. – 1996. – Т. 27, № 4. – С. 30–43.
44. Мартусевич А.К. Влияние активных форм кислорода на состояние энергетического обмена в крови и тканях животных / А.К. Мартусевич, А.Г. Соловьева // Экспериментальная медицина. – 2013. – № 3. – С. 64–65.
45. Мартусевич А.К. Влияние свободного и депонированного оксида азота на энергетический метаболизм крови / А.К. Мартусевич, А.Г. Соловьева, С.П. Перетягин // Биомедицина. – 2013. – № 1. – С. 103–108.

46. Методы биохимических исследований: липидный и энергетический обмен / под ред. М.И. Прохоров. – Ленинград : Изд-во ЛГУ, 1982. – 272 с.
47. Механизмы биологической активности облученной УФ светом аутокрови (УФО-аутокрови) / В.А. Крыленков [и др.] // Тезисы докладов I Всесоюзного биофизического съезда. – Москва, 1982. – Т. 4. – С. 74.
48. Митогенактивированные протеинкиназы JNK и P38 – редокс-зависимые молекулярные мишени нарушения апоптоза при окислительном стрессе / Н.В. Рязанцева [и др.] // Успехи физиологических наук. – 2009. – Т. 40, № 2. – С. 3–11.
49. Модуляция программируемой гибели лимфоцитов периферической крови при хронической вирусной инфекции / О.Б. Жукова [и др.] // Цитология. – 2007 – Т. 49, № 1. – С. 26–31.
50. Нарциссов Р.П. Прогностические возможности клинической цитохимии / Р.П. Нарциссов // Советская педиатрия. – 1984. – Вып. 2. – С. 267–275.
51. Нестерова И.В. Цитокиновая регуляция и функционирующая система нейтрофильных гранулоцитов / И.В. Нестерова, Н.В. Колесникова // Гематология и трансфузиология. – 1999. – Т. 44, № 2. – С. 43–47.
52. Новиков Д.К. Оценка иммунного статуса / Д.К. Новиков, В.И. Новикова. – Москва : Витебский мединститут, 1996. – 281 с.
53. Новицкий В.В. Физиология и патофизиология эритроцита / В.В. Новицкий, Н.В. Рязанцева. – Томск : Изд-во Томск. Ун-та, 2004. – 202 с.
54. О количественном определении карбоксигемоглобина и карбоксимиоглобина : метод. указания / В.Ф. Крамаренко [и др.]. – Москва, 1974. – 17 с.
55. Особенности метаболизма УФ-облученных лимфоцитов / В.Г. Артюхов [и др.] // Радиационная биология. Радиозэкология. – 2011. – Т. 51, № 2. – С. 252–257.
56. Поляничко А.М. Электрофорез в агарозном геле / А.М. Поляничко. – Санкт-Петербург : Изд-во СПбГУ, 2007. – 42 с.
57. Потапнев М.П. Апоптоз клеток иммунной системы и его регуляция цитокинами / М.П. Потапнев // Иммунология. – 2002. – № 4. – С. 237–243.
58. Потапнев М.П. Цитокиновая сеть нейтрофилов при воспалении / М.П. Потапнев // Иммунология. – 1995. – № 4 – С. 34–40.

59. Приседский В.В. Молекулярные орбитали / В.В. Приседский. – Донецк : ДонНТУ, 2009. – 42 с.
60. Пути реализации апоптоза лимфоцитов человека, индуцированного УФ-светом и активными формами кислорода / В.Г. Артюхов [и др.] // Радиационная биология и радиоэкология. – 2011. – Т. 51, № 4. – С. 425–443.
61. Рецепторные каспазозависимый и каспазозависимый пути апоптоза, индуцированного УФ-излучением в лимфоцитах человека / В.Г. Артюхов [и др.] // Радиационная биология. Радиоэкология. – 2009. – Т. 49, № 4. – С. 432–437.
62. Робинсон М.В. Апоптоз и цитокины / М.В. Робинсон, В.А. Труфакин / Успехи современной биологии. – 1999. – Т. 119, № 4. – С. 359–367.
63. Робинсон М.В. Морфология и метаболизм лимфоцитов / М.В. Робинсон. – Новосибирск : Наука, 1986. – 125 с.
64. Ройт А. Иммунология / А. Ройт, Дж. Бростофф, Д. Мейл. – Москва : Мир, 2000. – 592 с.
65. Рощупкин Д.И. Основы фотобиологии / Д.И. Рощупкин, В.Г. Артюхов. – Воронеж : ВГУ, 1997. – 116 с.
66. Рощупкин Д.И. Биофизика органов / Д.И. Рощупкин, Е.Е. Фесенко, В.И. Новоселов. – Москва : Наука, 2000. – 255 с.
67. Рубин А.Б. Биофизика / А.Б. Рубин // Биофизика клеточных процессов. – Москва : Высшая Школа, 1998. – Кн. 2. – 303 с.
68. Самойлова К.А. Механизмы влияния облученной ультрафиолетовыми лучами крови на организм человека и животных / К.А. Самойлова, Р.А. Арцишевская, К.Д. Оболенская. – Ленинград : Наука, 1986. – С. 236–247.
69. Северина И.С. Оксид азота. Роль растворимой гуанилатциклазы в механизмах его физиологических эффектов / И.С. Северина // Вопросы медицинской химии. – 2002. – № 48. – С. 3–35.
70. Сербин М.Е. Апоптоз и его молекулярные эффекторы / М.Е. Сербин, Е.В. Щербак // Актуальные проблемы биологии, медицины и экологии : сб. науч. тр. / под ред. Н.Н. Ильинских. – Томск : Сибирск. гос. мед. ун-т, 2004. – Вып. 1.

71. Соловьева А.Г. Изучение состояния ферментных систем печени как показателя эффективности местного лечения ожоговой травмы в эксперименте / А.Г. Соловьева, Ю.В. Зимин // Современные технологии в медицине. – 2013. – № 5 (2). – С. 20–24.
72. Страйер Л. Биохимия : в 3 т. / Л. Страйер. – Москва : Мир, 1985. – Т. 2. – 312 с.
73. Теория и практика иммуноферментного анализа / В.А. Егоров, А.П. Осипов, Б.Б. Дзантиев, Е.М. Гаврилова. – Москва : Высшая школа, 1991. – 288 с.
74. Тиунов Л.А. О причинах различий содержания окиси углерода в выдыхаемом воздухе у человека / Л.А. Тиунов, А.И. Клиорин, М.И. Колосова // Физиологический журнал. – 1972. – Т. 58, № 11. – С. 756–759.
75. Тиунов Л.А. Токсикология окиси углерода / Л.А. Тиунов, В.В. Кустов. – Москва : Медицина, 1980. – 228 с.
76. Тронов В.А. Механизм радиационной гибели лимфоцитов в периферической крови человека, оцениваемой методом ДНК-комет / В.А. Тронов, Д.Г. Терещенко, М.А. Конопляников // Биофизика. – 1998. – Т. 43, № 1. – С. 115–124.
77. Труфакин В.А. Иммуноморфологические аспекты аутоиммунных процессов / В.А. Труфакин. – Новосибирск : Наука, 1983. – 178 с.
78. Уровень экспрессии трансмембранных CD2 рецепторов нативными и УФ-облученными Т-лимфоцитами человека и их способность вступать в реакции розеткообразования с эритроцитами барана / В.Г. Артюхов [и др.] // Вестник ВГУ. Серия : Биология. Фармация. Химия. – 2008. – № 1. – С. 74–79.
79. Флуоресцентные методы в исследовании УФ-индуцированных изменений структурно-функционального состояния лимфоцитов крови человека / В.Г. Артюхов [и др.] // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2012. – Т. 153, № 6. – С. 891–895.
80. Фотопревращение мембранных липидов и его роль в изменении функций биомембран по действие УФ-излучения: Молекулярные механизмы биологического действия оптического излучения / Д.И. Рощупкин [и др.]. – Москва : Наука, 1988. – С. 79–92.

81. Фрагментация ДНК лимфоцитов человека в динамике развития апоптоза, индуцированного воздействием УФ-излучения и активных форм кислорода / В.Г. Артюхов [и др.] // Цитология. – 2011. – Т. 53, № 1. – С. 61–67.
82. Фрейдлин И.С. Клетки иммунной системы / И.С. Фрейдлин, А.А. Тотолян. – Санкт-Петербург : Наука, 2001. – 390 с.
83. Хайдуков С.В. Проточная цитометрия как современный метод анализа в биологии и медицине / С.В. Хайдуков, А.В. Зурочка // Медицинская иммунология. – 2007. – Т. 9, № 4-5. – С. 373–378.
84. Хаитов Р.М. Иммунология : учебник / Р.М. Хаитов, Г.Л. Игнатьева, И.Г. Сидорович. – Москва : Медицина, 2000. – 432 с.
85. Шмидт Р. Физиология человека / Р. Шмидт, Г. Тевс. – Москва : Мир, 2005. – Т. 3. – 228 с.
86. Ярилин А.А. Иммуитет и радиация / А.А. Ярилин, Н.И. Шарый. – Москва : Знание, 1991. – 64 с.
87. Ярилин А.А. Интерлейкин-7 и другие лимфопоэтины / А.А. Ярилин // Иммунология. – 2000. – № 1. – С. 4–13.
88. Ярилин А.А. Основы иммунологии : учебник / А.А. Ярилин. – Москва : Медицина, 1999. – 608 с.
89. A globin in the nucleus! / E. Geuens [et al.] // J. Biol. Chem. – 2003. – Vol. 278, № 33. – P. 30417–30420.
90. A mitochondrial perspective on cell death / P. Bernardi [et al.] // Trends Biochem. Sci. – 2001. – Vol. 26. – P. 112–117.
91. Adamas J.M. Ways of dying: multiple pathways to apoptosis / J.M. Adamas // Genes and Dev. – 2003. – Vol. 17. – P. 2481–2495.
92. Allena R.T. Mechanisms controlling cellular suicide: role of Bcl-2 and caspases / R.T. Allena, M.W. Cluckb, D.K. Agrawal // Cell. Mol. Life. Sci. – 1998. – Vol. 54. – P. 427–445.
93. Altura R.A. Nuclear expression of Survivin in pediatric ependymomas and choroid plexus tumors correlates with morphologic tumor grade / R.A. Altura, R.S. Olshevski, D.B. Boue // Cancer, 2000. – Vol. 89. – P. 1743–1749.

94. Architecture of succinate dehydrogenase and reactive oxygen species generation / V. Yankovskaya [et al.] // *Science*. – 2003. – Vol. 5607, № 299. – P. 700–704.
95. Armant M. IL-2 and IL-7 but not IL-12 protect natural killer cells from death by apoptosis and upregulate bcl-2 expression / M. Armant, G. Delespesse, M. Sarfati // *Immunology*. – 1995. – Vol. 85, № 2. – P. 331–337.
96. ASC is a Bax adaptor and regulates the p53-Bax mitochondrial apoptosis pathway / T. Ohtsuka [et al.] // *Nature Cell Biol.* – 2004. – Vol. 6. – P. 121–128.
97. Ashley A. The Role of Carbon Monoxide as a Gasotransmitter in Cardiovascular and Metabolic Regulation / Ashley A. Untereiner, Wu Lingyun, Wang Rui // *Gasotransmitters: Physiology and Pathophysiology*, 2012. – P. 37–70.
98. Avertebrate globin expressed in the brain / T. Burmester [et al.] // *Nature*. – 2000. – Vol. 407. – P. 520–523
99. Bacon K.B. Chemokines in disease models and pathogenesis / K.B. Bacon, J.J. Oppenheim // *Cytokine Growth Factor Rev.* – 1998. – Vol. 9, № 2. – P. 167–173.
100. Bar P.R. Apoptosis – the cell's silent exit / P.R. Bar // *Life Sci.* - 1996. – Vol. 59. – P. 369–378.
101. Bcl-2 and Bax regulate the channel activity of the mitochondrial adenine nucleotide translocator / C. Brenner [et al.] // *Oncogene*. – 2000. – Vol. 19. – P. 329–336.
102. Borner C. The Bcl-2 protein family: sensors and checkpoints for life-or-death decisions / C. Borner // *Mol. Immunol.* – 2003. – Vol. 39. – P. 615–647.
103. Bortner C.D. Apoptotic volume decrease and the incredible shrinking cell / C.D. Bortner, J.A. Cidlowski // *Cell Death Differ.* – 2002. – Vol. 9. – P. 1307–1310.
104. Carbon monoxide has anti-inflammatory effects involving the mitogen-activated protein kinase pathway / L.E. Otterbein [et al.] // *Nature Med.* – 2000. – № 6. — P. 422–428.
105. Carbon monoxide prevents hepatic mitochondrial membrane permeabilization / C.S. Queiroga [et al.] // *BMC Cell Biol.* – 2011. – Vol. 12. – P. 1–8.
106. Carbon monoxide promotes Fas/CD95-induced apoptosis in Jurkat cells / R. Song [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 2004. – № 279. – P. 44327–44334.

107. Carbon monoxide protects pancreatic β -cells from apoptosis and improves islet function/survival after transplantation / L. Gunther [et al.] // *Diabetes*. – 2002. – Vol. 51. – P. 994–999.
108. Cardiopulmonary bypass increases endogenous carbon monoxide production / S.A. Loer [et al.] // *J. Cardiothorac. Vasc. Anesth.* – 2009. – Vol. 23, № 6. – P. 802–806.
109. Cellular overexpression of heme oxygenase-1 up-regulates p21 and confers resistance to apoptosis / P. Inguaggiato [et al.] // *Kidney Int.* – 2001. – № 60. – P. 2181–2191.
110. Cheng E.H. Bcl-2, Bcl-xL sequester BH3 domain-only molecules preventing Bax- and Bak-mediated mitochondrial apoptosis / E.H. Cheng [et al.] // *Mol. Cell.* – 2001. – Vol. 8. – P. 705–711.
111. Choi A.M. Emerging role of carbon monoxide in physiologic and pathophysiologic states / A.M. Choi, L.E. Otterbein // *Antioxid Redox Signal.* – 2002. – Vol. 4, N 2. – P. 227–228.
112. Coceani F. Carbon monoxide in vasoregulation: the promise and the challenge / F. Coceani // *Circ. Res.* – 2008. – Vol. 86. – P. 1184–1186.
113. Cooper T.G. Mitochondria and glyoxysomes from castor bean endosperm. enzyme constituents and catalytic capacity / T.G. Cooper, H.J. Beevers // *J. Biol. Chem.* – 1969. – Vol. 244. – P. 3507–3513.
114. De Vries J.E. Immunosuppressive and anti-inflammatory properties of interleukin 10 / J.E. de Vries // *Ann. Med.* – 1995. – Vol. 27. – P. 537–541.
115. Drabkin D. A simplified technique for large scale crystallization of myoglobin and hemoglobin in the crystalline / D. Drabkin // *Arch. Biochem.* – 1949. – Vol. 21. – P. 224–226.
116. Dragovich T. Signal transduction pathways that regulate cell survival and cell death / T. Dragovich, C.M. Rudin, C.B. Thompson // *Oncogene*. – 1998. – Vol. 17. – P. 3207–3213.
117. Endogenous carbon monoxide production: a rare and detrimental complication of extracorporeal membrane oxygenation / B. Meyns [et al.] // *ASAIO J.* – 2008. – Vol. 54, № 6. – P. 633–635.

118. Finkel E. The mitochondrion: is it central to apoptosis? / E. Finkel // *Science*. – 2001. – Vol. 292. – P.624–626.
119. Galluzzi L. Mitochondria as therapeutic targets for cancer chemotherapy / L. Galluzzi // *Oncogene*. – 2006. – Vol. 25. – P. 4812–4830.
120. Granchi C. Anti-cancer agents counteracting tumor glycolysis / C. Granchi, F. Minutolo // *Chem. Med. Chem.* – 2012. – Vol. 8, № 7. – P. 1318–1350.
121. Green D.R. Activation-induced apoptosis in lymphocytes / D.R. Green, D.W. Scott // *Curr. Opin. Immunol.* – 1994. – Vol. 6. – P. 476–487.
122. Green D.R. Apoptotic pathways: The roads to ruin / D.R. Green // *Cell*. – 1998. – Vol. 94. – P. 695–698.
123. Green D.R. Mitochondria and apoptosis / D.R. Green, J.C. Reed // *Cell Tissue Res.* – 1998. – Vol. 301. – P. 5–17.
124. Gross A. Bcl-2 family members and the mitochondria in apoptosis / A. Gross, J. M. McDonnell, S.J. Korsmeyer // *Genes & Dev.* – 1999. – Vol. 13. – P. 1899–1911.
125. Guanylyl cyclases and signaling by cyclic GMP / K.A. Lucas [et al.] // *Pharmacol. Rev.* – 2000. – Vol. 52. – P. 375–413.
126. Hamdanet D. The redox state of the cell regulates the ligand binding affinity of human neuroglobin and cytoglobin / D. Hamdanet, L. Kigert, S. Dewilde // *J. Biol. Chem.* – 2003. – Vol. 278, № 61. – P. 61713–61721.
127. Hengartner M.O. The biochemistry of apoptosis / M.O. Hengartner // *Nature*. – 2000. – Vol. 407. – P. 770–776.
128. Hessain S.P. Biological network: at the crossroads of the cellular-stress response pathway and molecular carcinogenesis / S.P. Hessain, C.C. Harris // *J. Nippon Med. School*. – 2006. – Vol. 73. – P. 54–64.
129. Ho P.K. Mammalian initiator apoptotic caspases / P.K. Ho, C.J. Hawkins // *FEBS J.* – 2005. – Vol. 272. – P. 5436–5453.
130. Hobbs A.J. Nitric oxide-cyclic GMP-signal transduction system / A.J. Hobbs, L.J. Ignarro // *Methods Enzymol.* – 1996. – Vol. 269. – P. 134–148.
131. Holcik M. XIAP, the guardian angel / M. Holcik, R.G. Korneluk // *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* – 2001. – Vol. 2. – P. 550–556.

132. Inguaggiato P. Cellular overexpression of heme oxygenase-1 up-regulates p21 and confers resistance to apoptosis / P. Inguaggiato P. // *Kidney Int.* – 2001. – Vol. 60. – P. 2181–2191.
133. Interactions of multiple gas-transducing systems: hallmarks and uncertainties of CO, NO and H₂S gas biology / M. Kajimura [et al.] // *Antioxidants and Redox Signaling.* – 2010. – Vol. 13. – P. 157–193.
134. Janssen-Heininger Y.M. Recent advances towards understanding redox mechanisms in the activation of nuclear factor kappaB / Y.M. Janssen-Heininger, M.E. Poynter, P.A. Baeuerle // *Free Radic. Biol. Med.* – 2000. – Vol. 28. – P. 1317–1327.
135. Kam P.C. Apoptosis: mechanisms and clinical implications / P.C. Kam, N.I. Ferch // *Anaesthesia.* – 2000. – Vol. 6. – P. 513–519.
136. Kaufmann S.H. Induction of apoptosis by cancer chemotherapy / S.H. Kaufmann, W.C. Earnshaw // *Exp. Cell Res.* – 2000. – Vol. 256. – P. 42–49.
137. Kerr J.F.R. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics / J.F.R. Kerr, A.H. Wyllie, A.R. Currie // *Br. J. Cancer.* – 1972. – Vol. 26. – P. 239–257.
138. Krammer P.H. CD95's deadly mission in the immune system / P.H. Krammer // *Nature.* – 2000. – Vol. 407. – P. 789–795.
139. Krammer P.H. Life and death in peripheral T cells / P.H. Krammer, R. Arnold, I.N. Lavric // *Nat. Rev. Immunol.* – 2007. – Vol. 7. – P. 532–542.
140. Kroemer G. Mitochondrial control of cell death / G. Kroemer, J.C. Reed // *Nature Med.* – 2000. – Vol. 6. – P. 513–519.
141. Kuwana T. Bid, Bax, and lipids cooperate to form supramolecular openings in the outer mitochondrial membrane / T. Kuwana, M.R. Mackey, G. Perkins // *Cell.* – 2002. – Vol. 111. – P. 331–342.
142. Lautier D. Endogenous glutathione levels modulate both constitutive and UVA radiation/hydrogen peroxide inducible expression of the human heme oxygenase gene / D. Lautier, P. Luscher, R.M. Tyrrell // *Carcinogenesis.* – 1992. – № 13. – P. 227–232.

143. Legraud-Poels S. Nf-kappa B: an important transcription factor in photobiology / S. Legraud-Poels // *J. Photochem. Photobiol.* – 1998. – Vol. 45. – P. 1–8.
144. Leist M. Four deaths and a funeral: from caspases to alternative mechanisms / M. Leist, M. Jaattela // *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* – 2001. – Vol. 2. – P. 589–598.
145. Lin Y. Pidd, a new death-domain-containing protein, is induced by p53 and promotes apoptosis / Y. Lin, W. Ma, S. Benchimol // *Nat. Genet.* – 2000. – Vol. 26. – P. 122–127.
146. Litvinova L.S. Cytokine mediated apoptosis of granulocyte eosinophils in expressed blood eosinophilia / L.S. Litvinova, N.V. Ryazantseva, V.V. Novitskii // *Cell Tissue Biol.* – 2008. – Vol. 2, № 1. – P. 33–37.
147. Locker G. The morphology of apoptosis / G. Locker // *Cell Tissue Res.* – 2000. – Vol. 301. – P. 5–17.
148. Lynch S. Variation in the rate of endogenous carbon monoxide production in normal human beings / S. Lynch, A. Moede // *J. Lab. Clin. Med.* – 1972. – Vol. 79, № 1. – P. 85.
149. Marilena G. New physiological importance of two classic residual products: carbon monoxide and bilirubin / G. Marilena // *Biochem. Mol. Med.* – 1997. – Vol. 61, N 2. – P. 136–142.
150. Martinou J.–C. Breaking the mitochondrial barrier / J.–C. Martinou, D.R. Green // *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* – 2001. – Vol. 2. – P. 63–67.
151. Molecular cloning and expression of the Fas ligand, a novel member of the tumor necrosis factor family / T. Suda [et al.] // *Cell.* – 1993. – № 75. – P. 1169–1179.
152. Nondominant parietotemporal cortical dysplasia manifesting as hypermotor seizures / H. Nishibayashi [et al.] // *Epilepsy Behav.* – 2009. – Vol. 14, № 4. – P. 691–695.
153. Orrenius S. Mitochondrial oxidative stress: implications for cell death / S. Orrenius, V. Gogvadze, B. Zhivotovsky // *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* – 2007. – Vol. 47. – P. 19.1–19.41.
154. Oyedotun K.S. The quaternary structure of the *Saccharomyces cerevisiae* succinate dehydrogenase. Homology modeling, cofactor docking, and molecular dynamics simu-

- lation studies / K.S. Oyedotun, B.D. Lemire // *J. Biol. Chem.* – 2004. – Vol. 10, № 279. – P. 9424–9431.
155. Piantadosi C.A. Hydroxyl radical production in the brain after CO hypoxia in rats / C.A. Piantadosi, L. Tatro, J. Zhang // *Free Radic. Biol. Med.* – 1995. – № 18. – P. 603–609.
156. Piantadosi C.A. Biological chemistry of carbon monoxide / C.A. Piantadosi // *Antioxid and redox sign.* – 2002. – Vol. 4, № 2. – P. 259–270.
157. 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 / H. Murahashi [et al.] // *J. Leukocyte Biol.* – 2003. – Vol. 73. – P. 399–406.
158. Regulation of apoptotic protease activating factor-1 oligomerization and apoptosis by the WD-40 repeat region / C. Adrain [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 1999. – Vol. 274. – P. 20855–20860.
159. Schulze-Osthoff K. Redox signalling by transcription factors NF-kappa B and AP-1 in lymphocytes / K. Schulze-Osthoff, M. Los, P. Baeuerle // *Biochem. Pharmacol.* – 1995. – Vol. 50. – P. 735–741.
160. Schwitzguebel I.P. Purification of Peroxisomes and Mitochondria from Spinach Leaf by Percoll Gradient Centrifugation / I.P. Schwitzguebel, P.A. Siegenthaler // *American Society of Plant Biologists.* – 1984. – Vol. 75, № 75. – P. 670–674.
161. Shapiro H.M. Practical flow cytometry / H.M. Shapiro. – New York : WILEY-LISS Inc. ; Chichester ; Brisbane ; Toronto & Singapore, 1995. – P. 542.
162. Shibahara S. The heme oxygenase dilemma in cellular homeostasis: new insights for the feedback regulation of heme catabolism / S. Shibahara // *Tohoku J. Exp. Med.* – 2003. – Vol. 200, № 4. – P. 167–186.
163. Simultaneous production of carbon monoxide and thiobarbituric acid reactive substances in rat tissue preparations by an iron ascorbate system / H.J. Vreman [et al.] // *Can. J. Physiol. Pharmacol.* – 1998. – Vol. 76. – P. 1057–1065.
164. Sources of carbon monoxide (CO) in biological systems and applications of CO detection technologies / P.A. Rodgers [et al.] // *Semin. Perinatol.* – 1994. – Vol. 18. – P. 2–10.

165. Structure of electron transfer flavoprotein-ubiquinone oxidoreductase and electron transfer to the mitochondrial ubiquinone pool / J. Zhang [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2006. – Vol. 44, № 103. – P. 16212–16217.
166. Survivin splice variants regulate the balance between the proliferation and cell death / H. Caldas [et al.] // *Oncogene.* – 2005. – Vol. 24. – P. 1994–2007.
167. The Bcl-2 regulated apoptotic pathway / S. Willis [et al.] // *J. Cell. Sci.* – 2003. – Vol. 116. – P. 4053–4056.
168. Thom S.R. Carbon monoxide mediated brain lipid peroxidation in the rat / S.R. Thom // *J. Appl. Physiol.* – 1990. – Vol. 68, № 3. – P. 997–1003.
169. Tobiume J.K. Involvement of Bcl-2 family proteins in p53-induced apoptosis / J.K. Tobiume // *Nippon Med. School.* – 2005. – Vol. 72. – P.192–193.
170. Treatment with carbon monoxide-releasing molecules (CO-RMs) during cold storage improves renal function at reperfusion / A. Sandouka [et al.] // *Kidney.* – 2006. – № 69. – P. 239–247.
171. 312-nanometer ultraviolet B-light (narrow-band UVB) induced apoptosis of T cells within psoriatic lesions / B.M. Osawa [et al.] // *Exp. Med.* –1999. – Vol. 189. – P. 711–718.
172. Ultraviolet light induces apoptosis via direct activation of CD95 (Fas/APO-1) independently of its ligand CD95L / Y. Aragane [et al.] // *J. Cell Biol.* – 1998. – Vol. 140. – P. 171–182.
173. Vaux D.L. Cell death in development / D.L. Vaux, S.J. Korsmeyer / *Cell.* 1999. – Vol. 96. –P. 245–254.
174. Vermeulen K. Apoptosis: mechanisms and relevance in cancer / K. Vermeulen, D.R. Van Bockstaele, Z.N. Berneman // *Ann. Hematol.* – 2005. – Vol. 84. – P.627–639.
175. Vieira H.L.A. Pathophysiology of mitochondrial cell death control / H.L.A. Vieira, G. Kroemer // *Cell. Mol. Life. Sci.* – 1999. – Vol. 56. – P. 971–976.
176. Vreman H.J. Carbon monoxide and carboxyhemoglobin / H.J. Vreman, D.K. Stevenson // *Adv. Pediatrics.* – 1995. – Vol. 42. – P. 303–334.

177. Wang C.Y. NF-kappaB antiapoptosis: induction of TRAF1 and TRAF2 and c-IAP1 and c-IAP2 to suppress caspase-8 activation / C.Y. Wang, M.W. Mayo, R.G. Korneluk // *Science*. – 1998. – Vol. 281. – P. 1680–1683.
178. Wang R. Two's company, three's a crowd: can H₂S be the third endogenous gaseous transmitter? / R. Wang // *Faseb J*. – 2002. – Vol. 16. – P. 1792–1798.
179. Wang X. The expanding role of mitochondria in apoptosis / X. Wang // *Genes dev*. – 2001. – Vol. 15. – P. 2922–2933.
180. Wu L. Carbon monoxide: Endogenous production, physiological functions, and pharmacological applications / L. Wu, R. Wang // *Pharmacol Rev*. – 2005. – Vol. 57, № 4. – P. 585–630.
181. Yang G. Hydrogen sulfide-induced apoptosis of human aorta smooth muscle cell via the activation of MAP kinases and caspases-3 / G. Yang, X. Sun, R. Wang // *Faseb J*. – 2004. – Vol. 18. – P. 1782–1784.
182. Zhivotovsky B. Caspase-2 function in response to DNA damage / K. Vermeulen, D.R. Van Bockstaele, Z.N. Berneman // *Biochem. Biophys. Res. Commun*. – 2005. – Vol. 331. – P. 359–867.
183. Zhu H. Signal transduction. How do cells sense oxygen? / H. Zhu, H.F. Bunn // *Science* – 2001. – Vol. 292. – P. 449–451.
184. Zuckerbraun B.S. Carbon monoxide protects against liver failure through nitric oxide-induced heme oxygenase 1 / B.S. Zuckerbraun, T.R. Billiar // *J. Exp. Med*. – 2003. – Vol. 198. – P. 1707–1716.

