На правах рукописи

Тюнина Ольга Ивановна

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

Специальность – 03.01.02. Биофизика

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Воронеж
2015

Работа выполнена в ФГБОУ ВПО
«Воронежский государственный университет»

Научный руководитель: доктор биологических наук, профессор
Артюхов Валерий Григорьевич

Официальные оппоненты: **Рощупкин Дмитрий Иванович**
доктор биологических наук, профессор
Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова,
кафедра общей и медицинской биофизики,
профессор

Лидохова Олеся Владимировна
кандидат биологических наук,
Воронежская государственная медицинская академия им. Н.Н. Бурденко,
кафедра патологической физиологии, ассистент

Ведущая организация: ФГБОУ ВПО «Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова»

Защита диссертации состоится «23» апреля 2015 года в 14:00 на заседании диссертационного совета Д.212.038.03 при Воронежском государственном университете по адресу: 394006 Воронеж, Университетская пл., 1, ауд. 59.

С диссертацией можно ознакомиться в зональной научной библиотеке Воронежского государственного университета и на сайте http://www.science.vsu.ru

Автореферат разослан «__» _____2015 года

Ученый секретарь
диссертационного совета,
доктор биологических наук Грабович М.Ю.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. Среди агентов, использующихся 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).

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

Иммунная система, ответственная за сохранение антигенного постоянства, включает большое число составляющих, 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 CO (оксид углерода (II), монооксид углерода, угарный газ). В настоящее время твердо установлено, что представления о CO 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 CO в низких концентрациях, наравне с NO, необходим для функционирования 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 CO 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 CO 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/м^2

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 *с* 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/м^2 и монооксида углерода (продолжительность экспозиции – 5÷90 мин.). Установлено, что УФ-свет (151 – 755 Дж/м^2) 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 *с* оксидазы (ЦО) лимфоидных клеток. Воздействие УФ-света в дозе 151 Дж/м^2 на лимфоциты способствовало снижению содержания белка Bcl-2, а в дозах 453 и 755 Дж/м^2 – повышению концентрации этого белка до первоначальных значений. Концентрация сурвивина в лизате иммуноцитов после облучения УФ-светом в дозах 151, 453 и 755 Дж/м^2 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 концентрации 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 пероксидного окисления липидов (ПОЛ) и, как следствие, – повышать антиоксидантные свойства клетки. Воздействие УФ-света в дозах 453 и 755 Дж/м^2 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/м^2) 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 лактатдегидрогеназы (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 монооксида углерода. Полученные экспериментальные данные раскрывают роль СО 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 Россия 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 Пущинской школы-конференции молодых ученых «Биология – наука XXI века» (Пущино, 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/м^2 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 антиапоптозных 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.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Глава 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

В главе изложены и проанализированы современные данные, полученные при изучении характеристик, особенностей строения и метаболизма лимфоцитов и эритроцитов крови человека. Рассмотрены морфологические особенности и молекулярные механизмы развития и регуляции программируемой клеточной гибели. Представлены основные работы, касающиеся вопросов исследования действия УФ-излучения и монооксида углерода на состояние клеток крови.

Глава 2. ОБЪЕКТ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объектом исследования явились лимфоциты и эритроциты крови доноров. Лимфоциты выделяли путем центрифугирования гепаринизированной крови в градиенте плотности фиколл-урографина (Д. Кэтти, 1991). Суспензии эритроцитов получали из крови путем центрифугирования в физиологическом растворе NaCl (0,9%) при 600 g в течение 10 мин.

Суспензии лимфоцитов и эритроцитов подвергали воздействию монооксида углерода в течение 5÷45, 60, 75 и 90 мин. 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). Количество образовавшегося монооксида углерода определяли спектрофотометрическим методом (В.Ф. Крамаренко, Б.А. Собчук и др., 1974) по содержанию карбоксигемоглобина в крови.

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 ^{0}C) 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/м^2 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/м^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 присутствии данных модификаторов проводили в питательной среде RPMI-1640 при температуре 37 ^{0}C в термостате ТС-80М в течение 24 ч. в атмосфере с 5%-ным содержанием CO_2.

Жизнеспособность СО-модифицированных лимфоцитов определяли с помощью теста с красителем трипановым синим.

Для изучения уровня экспрессии CD95 и CD8 маркеров на поверхности нативных и модифицированных лимфоцитов применяли методы твердофазного иммуноферментного анализа (ИФА) и проточной цитофлуориметрии.

При проведении ИФА использовали моноклональные антитела серии LT95 и LT8 соответственно к маркерам CD95 и CD8 («Сорбент», Москва) (В.А. Егоров, 1991).

Цитометрические исследования проводились на базе ГУЗ «Воронежский Областной Центр по профилактике и борьбе со СПИД и инфекционными заболеваниями» с применением проточного цитометра EPICS XL-MCL («Beckman Coulter», США). Данный прибор оснащен аргоновым лазером 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).

Структуру нативных и СО-модифицированных эритроцитов изучали с помощью сканирующего электронного микроскопа «JSM-6380 LU» (Япония) при ускоряющем напряжении 20-25 кВ.

Выделение ДНК из нативных, модифицированных монооксидом углерода и УФ-светом лимфоцитов проводили с использованием набора «ДНК-сорб-В» в соответствии с протоколом фирмы-производителя («Amplisens», ФГУН «ЦНИИЭ», Россия). Анализ изменений структурного состояния нуклеиновой кислоты осуществляли путем электрофореза в агарозном геле (А.М. Поляничко, 2007). Размеры фрагментов ДНК иммунокомпетентных клеток при проведении электрофореза в агарозном геле определяли с помощью Mass Ruller™ 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.

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.

Для определения активности митохондриальных ферментов лимфоциты лизировали путем гипоосмотического шока. Митохондрии выделяли общепринятым способом (М.И. Прохоров, 1982), в них определяли активность сукцинатдегидрогеназы (СДГ) (T.G. Cooper, 1969) и цитохром *c* оксидазы (ЦО) (I.P. Schwitzguebel, P.A. Siegenthaler, 1984). Измерения проводили на спектрофотометре «Shimadzu RF-5301 PC» (Япония).

Эритроциты гемолизировали по методу Драбкина (D. Drabkin, 1949). В гемолизатах нативных и СО-модифицированных эритроцитов определяли активность глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы, лактатдегидрогеназы в прямой и обратной реакции (ЛДГ пр. и ЛДГ обр.) по методу Кочетова Г.А. (Г.А. Кочетов, 1980), применяя спектрофотометрический анализ. Структурно-функциональные особенности поверхностной архитектоники мембран эритроцитов оценивали по классификации Г.И. Козинец, Ю.А. Симоврат (1984), рассчитывали индекс трансформации (ИТ), а также индексы обратимой и необратимой трансформации (ИОТ/ИНОТ).

Количественное определение содержания антиапоптозных белков Bcl-2 и сурвивина в лизате лимфоцитов крови человека проводили с применением наборов «Протеин Bcl-2», («BenderMedSystems», Австрия) и «Human total Survivin», («Enzo Life Science», США) соответственно согласно инструкции фирмы-производителя, используя «сэндвич»-метод иммуноферментного анализа.

Статистическую обработку результатов экспериментов проводили с помощью прикладной программы Microsoft Exel: 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

Показано, что при экспозиции лимфоцитов крови человека в атмосфере монооксида углерода в диапазоне времени 5÷90 мин. не происходит значительной гибели популяции клеток (87,7% остается жизнеспособной).

С помощью метода иммуноферментного анализа (ИФА) установлено снижение уровня экспрессии CD95 рецепторов на поверхности мембран СО-модифицированных лимфоцитов (время экспозиции – 60, 75 и 90 мин.), а спустя 24 ч. выявилось усиление данного эффекта (табл. 1).

Для выяснения причины уменьшения уровня экспрессии CD95 антигенов были проведены исследования с использованием блокаторов синтеза белка – циклогексимида и анизомицина. Выявлено, что циклогексимид не оказывал влияния на уровень экспрессии CD95 рецепторов лимфоцитами, длительное время находившимися в атмосфере СО (время экспозиции – 45÷90 мин.), хотя при меньших экспозициях в атмосфере монооксида углерода (время воздействия – 5÷30 мин.) наблюдалось угнетение синтеза анализируемых молекул иммунокомпетентными клетками.

Использование анизомицина позволило нам установить уменьшение уровня экспрессии CD95 рецепторов на поверхности лимфоцитов, инкубированных в атмосфере монооксида углерода в течение 5, 10, 15, 20 мин.

Результаты по исследованию экспрессии CD95 маркеров на поверхности мембран CO-модифицированных иммуноцитов (время экспозиции – 60, 75 и 90 мин.) методом проточной цитофлуориметрии позволили выявить сходные тенденции изменения их экспрессии, полученные нами ранее методом ИФА, что дает возможность с большей убедительностью говорить о наблюдаемых нами эффектах. Так, выявлено уменьшение средней интенсивности флуоресценции (СИФ) клеток после воздействия на смесь иммуноцитов монооксида углерода в течение 60, 75 и 90 мин. Наблюдаемое падение экспрессии CD95 маркеров на поверхности лимфоцитов после инкубации в атмосфере CO может свидетельствовать о нарушении Fas-опосредованного пути развития апоптоза и служить предпосылкой к развитию гипотезы об антиапоптотическом потенциале монооксида углерода.

Таблица 1

Уровень экспрессии CD95 рецепторов CO-модифицированных лимфоцитов крови человека до и после их суточного термостатирования

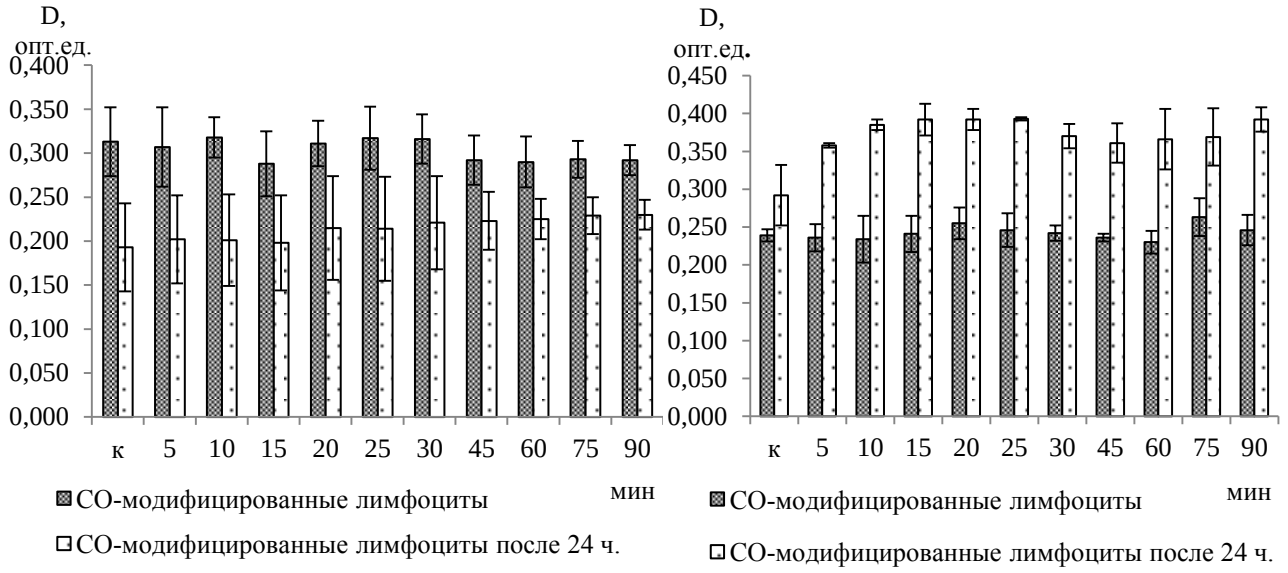
Время инкубации	Уровень экспрессии CD95 рецепторов CO-модифицированных лимфоцитов крови человека	Уровень экспрессии CD95 рецепторов CO-модифицированных лимфоцитов крови человека через 24 ч.
контроль	0,350±0,073	0,271±0,079
5 мин.	0,394±0,094	0,329±0,020
10 мин.	0,336±0,070	0,321±0,016
15 мин.	0,394±0,048	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

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.

На основании анализа значений экспрессии CD8 маркеров лимфоцитов и последующей ответной реакции на воздействие монооксида углерода исследуемые доноры были разделены на две группы. У доноров I группы изначально уровень экспрессии исследуемых антигенов на поверхности мембран лимфоцитов был выше по сравнению с лицами II группы. Инкубация лимфоцитов в атмосфере монооксида углерода (5÷90 мин.) способствовала снижению тестируемого показателя у лиц I группы и возрастанию – у доноров II группы. Это подтверждает иммуномодулирующее действие оксида углерода (II) после 24 ч. нахождения CO-модифицированных лимфоцитов в термостате на экспрессию CD8 молекул на поверхности мембран лимфоцитов. Разнонаправленная ответная реакция

иммуноцитов крови человека на воздействие оксида углерода (II), вероятно, обусловлена различной СО-чувствительностью CD8 рецепторов разных групп лиц (рис. 1 А, Б).



А Б

Рис. 1. Уровень экспрессии CD8 рецепторов СО-модифицированных лимфоцитов крови (I группа – А, II группа – Б)

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

Установлено, что при экспозиции лимфоцитов крови человека in vitro в атмосфере монооксида углерода (60, 75 и 90 мин.) фракция ДНК представлена полосой с молекулярной массой 10000 п.н., что характерно для ее интактной формы. Электрофоретическая подвижность (ЭФП) макромолекул изучаемых образцов составила 1,30 см.Через 24 ч. СО-модифицированных образцов (60, 75, 90 мин.) на электрофореграмме были обнаружены фрагменты высокомолекулярной ДНК, также соответствующей размерам 10000 п.н. 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 процессов программируемой клеточной гибели лимфоидных клеток в исследуемых условиях (рис. 2).

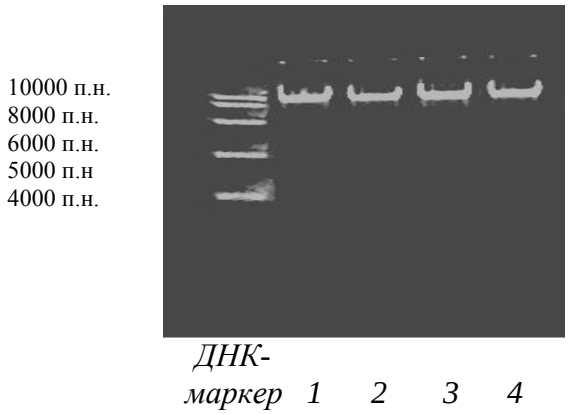


Рис. 2. Электрофореграмма ДНК лимфоцитов до (1) и после воздействия монооксида углерода в течение 60 (2), 75 (3) и 90 мин. (4)

Выявлено снижение параметров биохемилюминесценции после инкубации лимфоцитов в атмосфере СО (60 и 90 мин.), что указывает на уменьшение интенсивности протекания процессов ПОЛ и образования АФК в лимфоидных

клетках, а, следовательно, снижается вероятность развития апоптоза. Однако через 24 ч. инкубации СО-модифицированных лимфоцитов наблюдалось увеличение интенсивности свободнорадикальных процессов (рис. 3, 4).

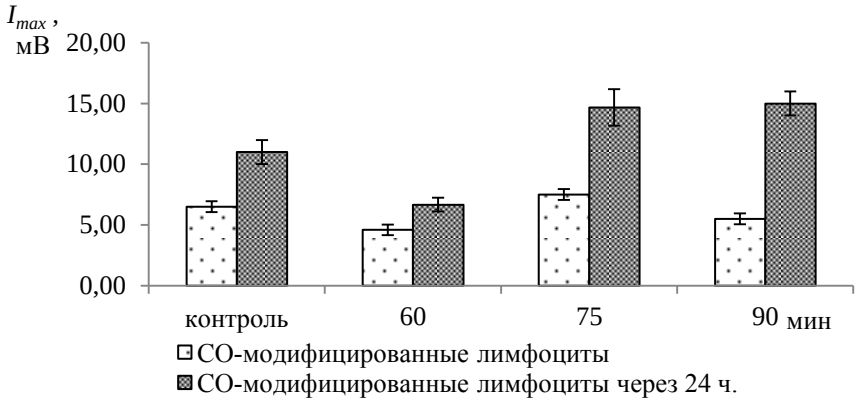


Рис. 3. Величины максимальной интенсивности хемилюминесценции (I_{max}) СО-модифицированных лимфоцитов до и после суточного термостатирования

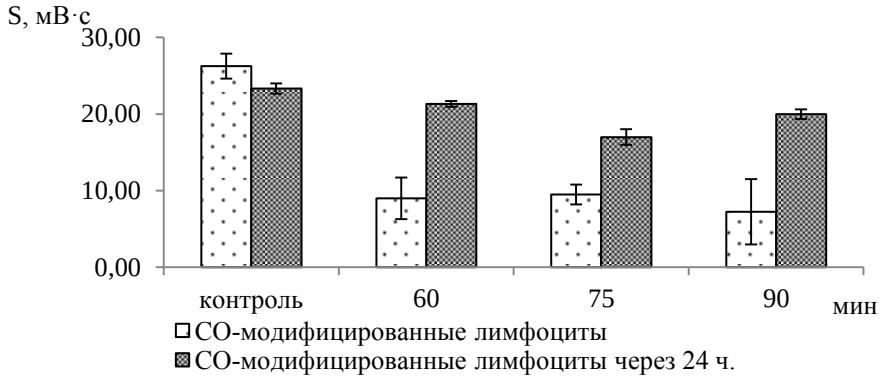


Рис. 4. Величины светосуммы (S) хемилюминесценции СО-модифицированных лимфоцитов до и после суточного термостатирования

Выявлено, что через 75 мин. воздействия СО на иммуноциты наблюдается возрастание каталитической активности сукцинатдегидрогеназы (СДГ), а после 24 ч. – снижение активности этого фермента. Уменьшение активности фермента СДГ в митохондриальной фракции суспензии СО-модифицированных клеток после ее повышения возможно обусловлено изменением состояния активного центра фермента, что сказывается, в свою очередь, на уменьшении его ферментативной активности. Нами не выявлено изменений активности ЦО лимфоцитов крови человека после воздействия монооксида углерода (60, 75 и 90 мин.). В процессе сохранения иммуноцитов в питательной среде RPMI-1640 в течение суток показано увеличение активности митохондриальной ЦО иммуноцитов, инкубированных в атмосфере монооксида углерода в течение 90 мин. Таким образом, монооксид углерода не изменял активность митохондриальных ферментов, а, возможно, способствовал конформационным перестройкам их молекул.

Установлено, что после воздействия на смесь иммуноцитов монооксида углерода в течение 60 и 90 мин. наблюдается повышение содержания антиапоптозного белка Bcl-2. Экспозиция лимфоцитов в течение 75 мин. в атмосфере оксида углерода (II) индуцировала понижение концентрации белка Bcl-2 (рис. 5).

У объектов, модифицированных СО в течение 75 и 90 мин. и дальнейшей суточной инкубации, происходило снижение анализируемого показателя.

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.

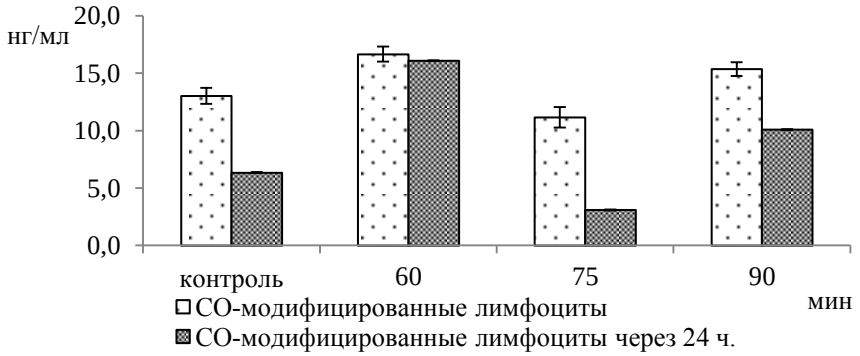


Рис. 5. Содержание белка Bcl-2 в лизатах СО-модифицированных лимфоцитов (60, 75 и 90 мин.) до и после суточного термостатирования образцов

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.

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

Нами установлено снижение количества белка сурвивина после инкубирования иммуноцитов в течение 60 мин. в атмосфере монооксида углерода. Выявлено, что в лизатах СО-модифицированных в течение 75 мин. клеток происходило повышение активности сурвивина до контрольных значений, однако, через 90 мин. этот показатель увеличивался (рис. 6).

Суточное хранение СО-модифицированных лимфоцитов крови человека (60, 75 и 90 мин.) приводило к гиперактивации сурвивина. Так, происходило возрастание его концентрации в 10,0; 3,3 и в 2,7 раза по сравнению с иммуноцитами без инкубации в термостате.

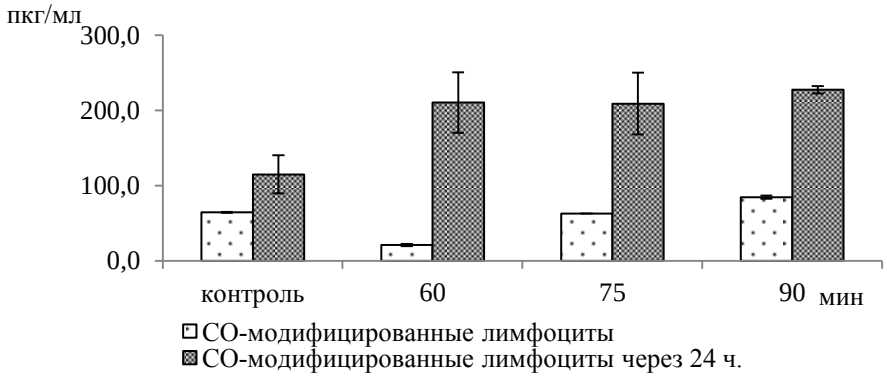
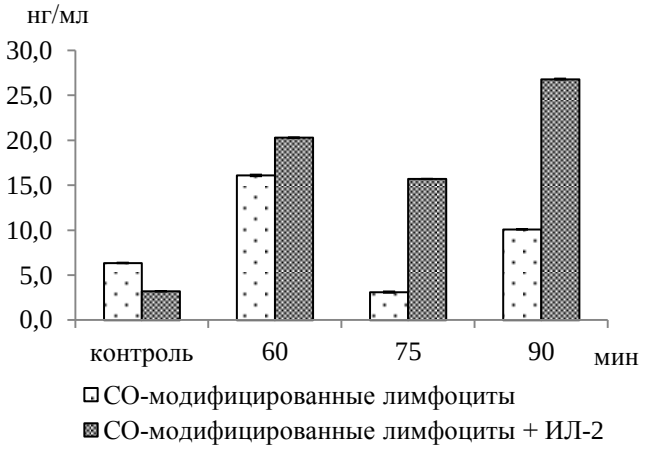


Рис. 6. Содержание белка сурвивина в лизатах СО-модифицированных лимфоцитов (60, 75 и 90 мин.) до и после суточного термостатирования

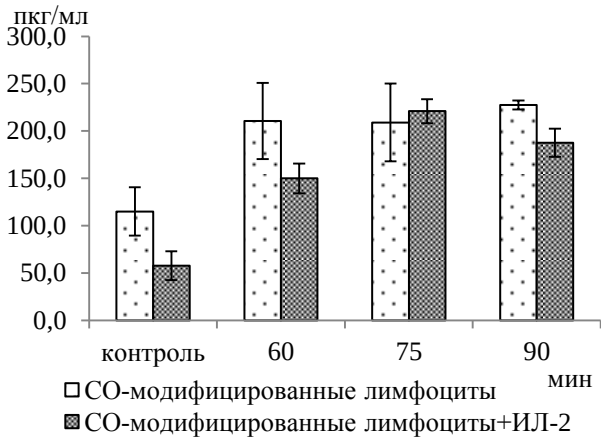
Таким образом, монооксид углерода, возможно, запускает пролиферацию внутриклеточных структур лимфоцитов через 24 ч. нахождения в термостате и повышает выживаемость этих клеток путем увеличения активности антиапоптотического фактора – сурвивина.

С целью выяснения вклада монооксида углерода в дизрегуляцию программируемой клеточной гибели лимфоцитов крови человека был использован рекомбинантный ИЛ-2 в апоптозиндуцирующей дозе.

Показано увеличение содержания Bcl-2 у СО-модифицированных клеток (60, 75 и 90 мин.) в присутствии цитокина. У СО-модифицированных в течение 60 и 90 мин. лимфоцитов рекомбинантный ИЛ-2 способствовал падению содержания антиапоптотического белка сурвивина (рис. 7 А, Б).



А



Б

Рис. 7. Содержание антиапоптозного белка Bcl-2 (А) и сурвивина (Б) 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

Монооксид углерода, предположительно, 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.

Таким образом, монооксид углерода (60, 75 и 90 мин.) участвует в процессах дизрегуляции апоптоза лимфоцитов крови человека.

Глава 4. ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ МОНООКСИДА УГЛЕРОДА НА ЭРИТРОЦИТЫ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА

Выявлено, что 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 архитектоники анализируемых нами клеток. У эритроцитов, подвергшихся 90-минутной инкубации в атмосфере СО, наблюдалось наибольшее изменение индекса трансформации, а также индексов обратимой и необратимой трансформации (рис. 8).

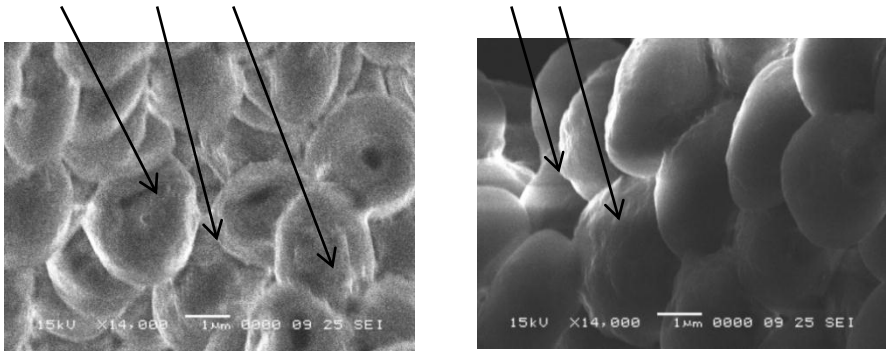
Таким образом, монооксид углерода вызывает гетерогенные изменения поверхностной архитектоники в популяции эритроцитов: увеличивается индекс трансформации клеток, появляется большое количество обратимо деформированных клеток, снижается доля дискоцитов. Выявленные нарушения структурных свойств эритроцитов свидетельствуют о нарушении функциональной активности эритроцитов после воздействия СО в течение 60, 75 и 90 мин. (табл. 2).

Установлено, что воздействие СО на эритроциты крови человека в течение 75 и 90 мин. индуцировало увеличение активности ЛДГобр. и снижение активности ЛДГпр. Таким образом, результаты наших исследований позволяют отметить, что монооксид углерода может предотвращать избыточную активацию ЛДГобр., способствующую синтезу лактата – известного молекулярного маркера гипоксии (А.К. Мартусевич, А.Г. Соловьева, 2013).

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 коэффициента баланса энергетических реакций (в среднем на

72,3%) по сравнению с контрольным значением. Этот сдвиг может отражать системную метаболическую дезадаптацию, формирующуюся в условиях воздействия монооксида углерода.

Выросты эритроцитарных мембран:



А Б

Рис. 8. Поверхностная архитектоника эритроцитов крови человека после воздействия оксида углерода (II) (время экспозиции 75 мин. (А) и 90 мин. (Б): (при увеличении 14000)

Таблица 2

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

Морфологическая форма	Интактные эритроциты	CO-модифицированные в течение 60 мин. эритроциты	CO-модифицированные в течение 75 мин. эритроциты	CO-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

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 подтверждение данными, полученными при исследовании поверхностной архитектоники эритроцитов в условиях модификации монооксидом углерода.

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

Нами установлено, что УФ-свет в дозах 453, 755 Дж/м^2 проявляет проапоптотическое действие: наблюдается возрастание количества маркера CD95 на поверхности мембран, что является предпосылкой к развитию программируемой клеточной гибели.

Выявлено снижение величины ЭФП молекулы ДНК иммуноцитов, подвергшихся УФ-облучению в дозах 151, 453 и 755 Дж/м^2. Таким образом, индуцируемые УФ-светом (151 – 755 Дж/м^2) процессы в молекуле ДНК лимфоцитов крови человека указывают на структурную модификацию молекулы нуклеиновой кислоты (рис. 9).

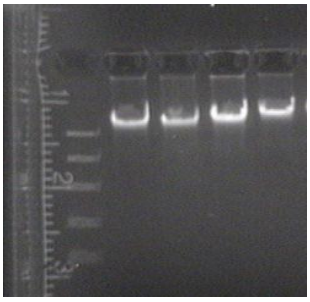


Рис.9. Электрофореграмма ДНК лимфоцитов до (1) и после воздействия УФ-света в дозах 151 (2), 453 (3) и 755 (4) Дж/м^2

Показано, что УФ-свет (151, 453, 755 Дж/м^2) способствовал повышению показателя I_{max}, что свидетельствует об интенсификации свободно-радикальных процессов, а увеличение параметра светосуммы означает снижение антиоксидантной активности лимфоцитов крови человека. Полученные результаты доказывают инициацию свободнорадикальных процессов, вызванных УФ-светом в иммунокомпетентных клетках.

Выявлено, что непосредственно после УФ-облучения суспензии нативных лимфоцитов крови доноров в дозах 151, 453 и 755 Дж/м^2 в клетках происходит дозозависимое уменьшение функциональной активности митохондриальной сукцинатдегидрогеназы и цитохром *с* оксидазы. Выявлено увеличение активности митохондриальной СДГ у УФ-модифицированных иммунокомпетентных клеток в дозах 151 и 453 Дж/м^2 до контрольных значений свежевыделенных клеток, а в дозе 755 Дж/м^2 – на 18,0% по сравнению с контролем через 24 ч. инкубации.

Установлено также снижение функциональной активности ЦО у УФ-модифицированных иммунокомпетентных клеток в дозах 453 и 755 Дж/м^2 через 24 ч.

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

Воздействие УФ-света в дозах 453 и 755 Дж/м^2 на лимфоидные клетки приводит к повышению количества белка Bcl-2 до первоначальных значений, но статистически значимых отклонений относительно контрольных величин выявлено не было. Однако УФ-свет в дозе 755 Дж/м^2 через 24 ч. инкубации в термостате индуцировал синтез антиапоптозного белка de novo. Повышение содержания Bcl-2 через 24 ч. после УФ-воздействия на лимфоидные клетки в дозе 755 Дж/м^2 позволяет расценивать этот факт как усиление процесса апоптоза.

Показано, что УФ-свет в дозах 151, 453 и 755 Дж/м^2 вызывает снижение содержания сурвивина, а через 24 ч. – увеличение количества изучаемого антиапоптозного белка.

Таким образом, УФ-излучение (151, 453 Дж/м^2) проявляет проапоптотические свойства, а в дозе 755 Дж/м^2 – способствует инициации иного пути развития программируемой клеточной гибели.

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

Показано, что комплексное воздействие монооксида углерода (60, 75 и 90 мин.) и УФ-света (151, 453 и 755 Дж/м^2) на иммуноциты доноров способствует разновекторным изменениям величины средней интенсивности флуоресценции CD95 рецепторов на поверхности их мембран (Рис. 10) и параметров биохемилюминесценции. После суточного хранения исследуемых лимфоидных клеток в превалирующем большинстве случаев наблюдалось увеличение интенсивности хемилюминесценции и ее светосуммы, что указывает на усиление свободнорадикальных процессов и снижение антиоксидантной защиты лимфоцитов в наблюдаемых условиях.

Нами не выявлено изменения ЭФП и фрагментации молекулы ДНК лимфоцитов крови человека в условиях сочетанного действия монооксида углерода (60, 75 и 90 мин.) и УФ-света (151, 453, 755 Дж/м^2).

После УФ-облучения в дозах 151, 453 и 755 Дж/м^2 СО-модифицированных (60, 75 и 90 мин.) лимфоцитов крови человека наблюдалось преимущественно падение функциональной активности СДГ. Увеличение активности СДГ de novo после 24 ч., вероятно, связано с активацией процесса аэробного пути окисления глюкозы, что позволяет клеткам снизить ее потребление в энергетических целях и сохранить достаточный уровень запаса АТФ.

Выявлено, что УФ-свет в дозах 151, 453 и 755 Дж/м^2 вызывает уменьшение 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.

Установлено, что УФ-облучение в дозах 151, 453 и 755 Дж/м^2 в превалирующем большинстве случаев приводило к увеличению экспрессии белка

Bcl-2 в лизате СО-модифицированных (60, 75 и 90 мин.) лимфоидных клеток доноров.

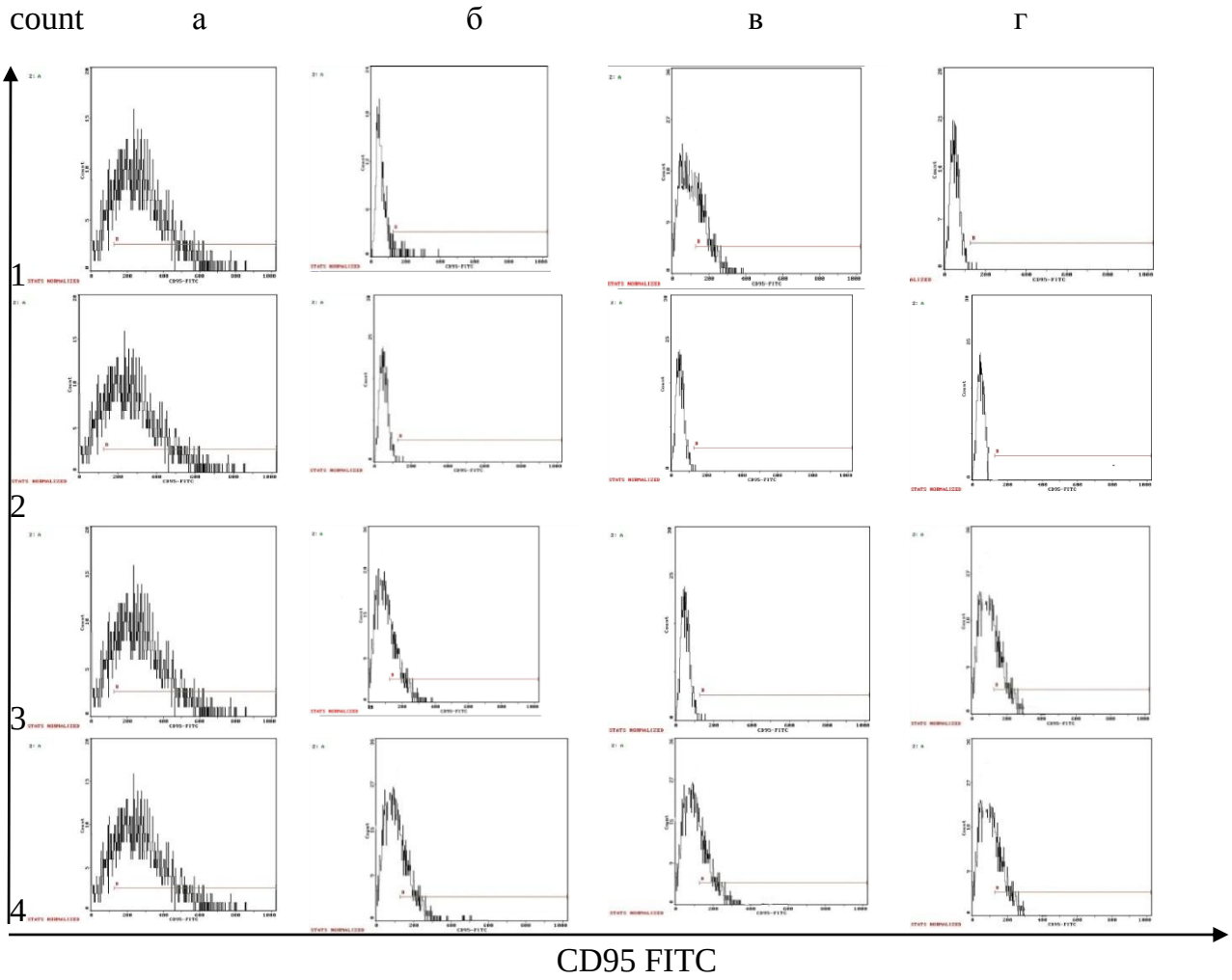


Рис. 10. Однопараметрические гистрограммы изменения уровня экспрессии CD95-маркеров на поверхности лимфоцитов крови человека, модифицированных монооксидом углерода и УФ-светом (специфическое окрашивание клеток, с которыми связывается значительное количество FITC-меченных антител к CD95), а – контрольные образцы; б, в, г – СО-модифицированные соответственно 60, 75, 90 мин. образцы; 1 – без облучения; 2 – 151 Дж/м^2; 3 – 453 Дж/м^2; 4 – 755 Дж/м^2.

Анализируя полученные нами данные, можно предположить, что монооксид углерода способствует поддержанию активности митохондрий и ферментов электрон-транспортной цепи 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/м^2) на лимфоциты крови человека через 24 ч. термостатирования приводило к снижению содержания антиапоптозного белка, что указывает на преобладание процессов, способствующих индукции апоптоза.

В наших экспериментах наблюдалось 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/м^2); 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/м^2) 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 обусловливает выживание клеток после воздействия экзогенного CO.

Методом электрофореза в агарозном геле не выявлено «апоптозной 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.

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 апопоза 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 иммуноциты 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.

Установлено, что УФ-свет в терапевтическом диапазоне доз (151, 453 и 755 Дж/м^2) 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/м^2) 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/м^2 повышает содержание белка Bcl-2 через 24 ч. после прекращения облучения, что дает основание расценивать это как возможную стадию инициации иного пути 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.

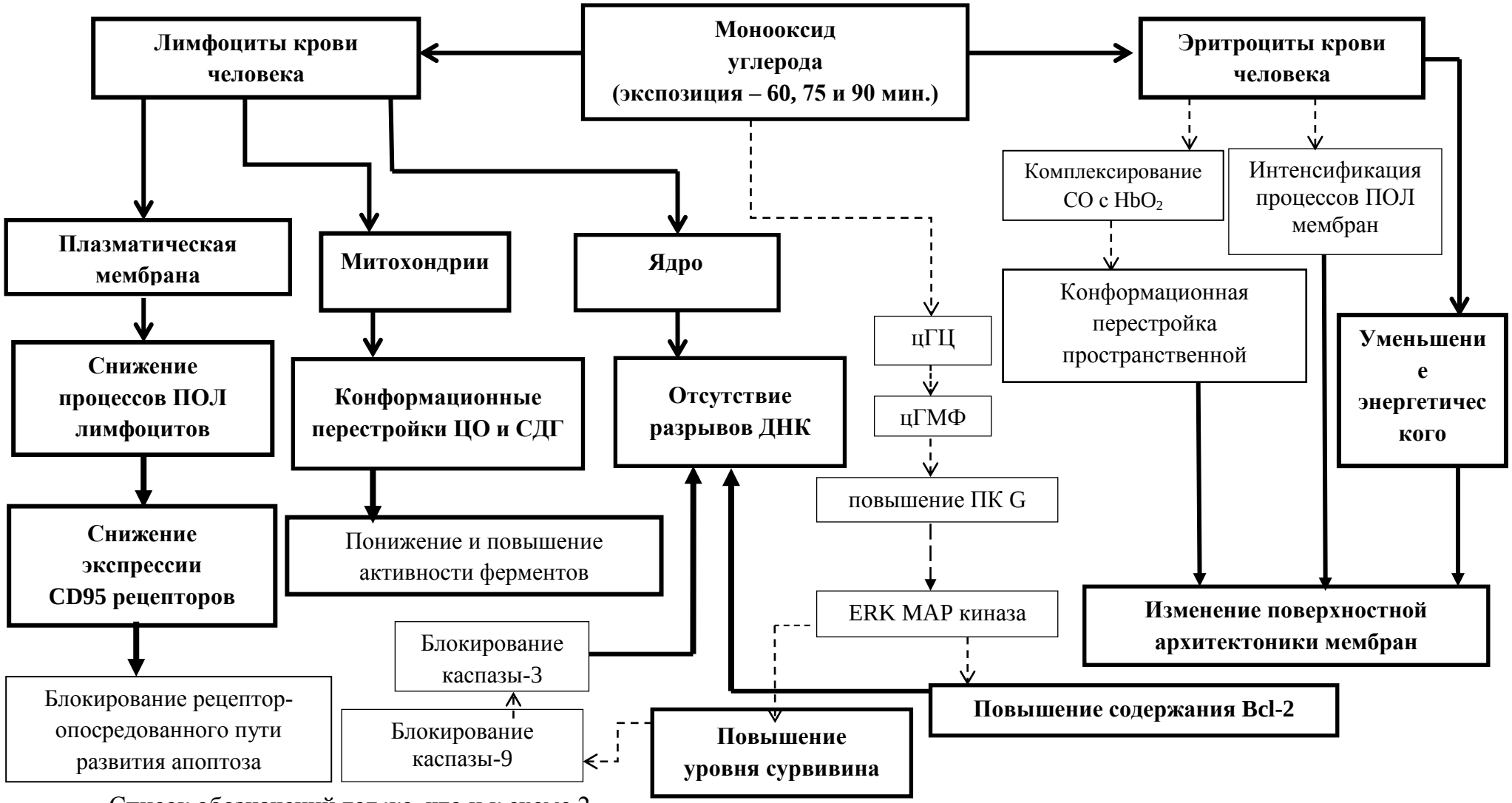
Комплексное воздействие монооксида углерода и УФ-света (151, 453 и 755 Дж/м^2) на лимфоциты крови человека проявляется в разновекторном изменении средней интенсивности флуоресценции CD95 рецепторов на поверхности их мембран.

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.

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/м^2).

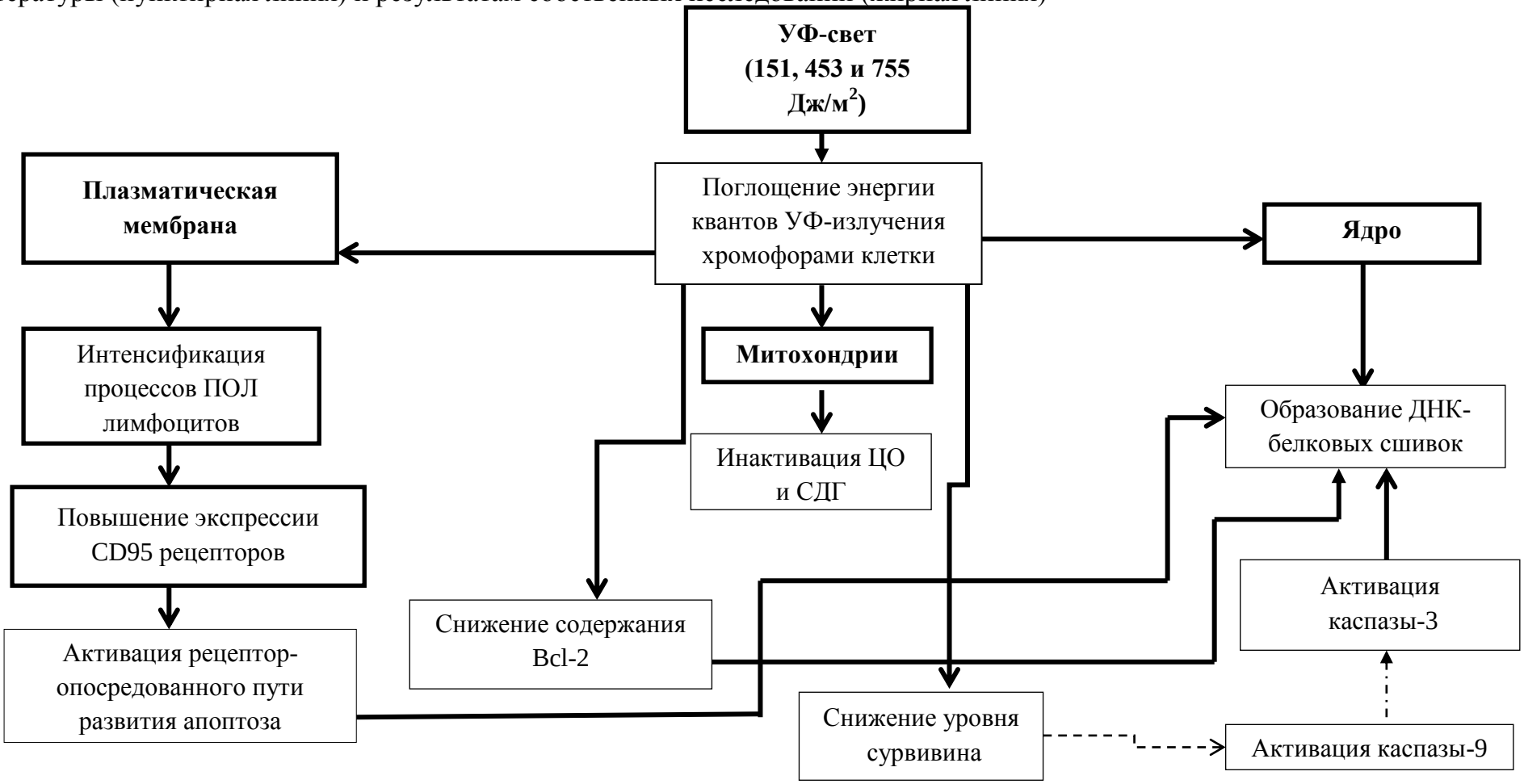
На основании результатов проведенных экспериментов и данных литературы предложены схемы процессов, протекающих при действии монооксида углерода (схема 1) и УФ-света (схема 2) на лимфоциты и эритроциты крови человека.

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)



Список обозначений тот же, что и к схеме 2

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; ПК G – протеинкиназа G; ERK MAP киназа – extracellular signal-regulated mitogen-activated protein kinase (внеклеточная сигнал-регулирующая митоген-активирующая киназа); CO – монооксид углерода; HbO_2 – 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/м^2 (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/м^2 по сравнению с контрольными образцами.
8. Воздействие УФ-света в дозах 151, 453, 755 Дж/м^2 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/м^2) клеток приводило к повышению активности сукцинатдегидрогеназы и одновременному понижению активности цитохром *c* оксидазы УФ-облученных лимфоцитов (453 и 755 Дж/м^2), что указывает на преобладание аэробного пути окисления глюкозы.
10. УФ-свет в дозе 755 Дж/м^2 способствует инициации иного пути развития 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/м^2 приводит к фотоинактивации сукцинатдегидрогеназы CO-модифицированных (время инкубации – 60, 75 и 90 мин.) иммуноцитов.
12. УФ-свет в дозах 453 и 755 Дж/м^2 способствовал увеличению содержания белка Bcl-2 CO-модифицированных (время экспозиции – 60, 75 и 90 мин.) лимфоидных клеток, а через 24 ч. наблюдалось уменьшение уровня изучаемого антиапоптозного белка (при CO-модификации 60, 75 и 90 мин. и УФ-облучения 151, 453 и 755 Дж/м^2).

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/м^2 и усиление этого эффекта через 24 ч. инкубирования иммуноцитов.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Бахметьева-Тюнина О.И. Влияние оксида углерода (II) на уровень экспрессии CD8 рецепторов лимфоцитами крови человека / О.И. Бахметьева-Тюнина, О.В. Путинцева, В.Г. Артюхов // Вестник ВГУ: серия Химия. Биология. Фармация. – 2011. – № 2. — С. 84–87.

2. Чувствительность CD95 и CD8 рецепторов мембран лимфоцитов крови человека к воздействию оксида углерода (II) / О.И. Бахметьева-Тюнина, С.Ю. Колядина, О.В. Путинцева, В.Г. Артюхов // Актуальные проблемы биологии, нанотехнологий и медицины: материалы IV Международной научно-практической конференции. Ростов-на-Дону, 22-25 сентября 2011 г. – Ростов-на-Дону, 2011. – С. 77.

3. Оценка цитотоксической активности лимфоцитов крови человека в условиях воздействия оксида углерода (II) / О.И. Бахметьева-Тюнина, С.Ю. Колядина, О.В. Путинцева, В.Г. Артюхов // Материалы: Симбиоз Россия, 2011: 4-го Всероссийского с международным участием конгресса студентов и аспирантов-биологов, Воронеж, 23-27 мая 2011 г. – Воронеж, 2011. – Т. 1. – С. 102–105.

4. Артюхов В.Г. Влияние монооксида углерода на экспрессию CD95 рецепторов лимфоцитов крови человека в различном диапазоне времени / В.Г. Артюхов, О.В. Путинцева, О.И. Бахметьева-Тюнина // Организация и регуляция физиолого-биохимических процессов: межрегиональный сборник научных работ. – Воронеж, 2010. – Вып. 12. – С. 35–40.

5. Бахметьева-Тюнина О.И. Изучение жизнеспособности и уровня экспрессии CD95 рецепторов лимфоцитарных клеток человека в условиях воздействия оксида углерода (II) / О.И. Бахметьева-Тюнина, О.В. Путинцева, В.Г. Артюхов // Интеллектуальный потенциал XXI века: ступени познания: сборник материалов 4-й Международной студенческой научно-практической конференции, 29 декабря 2010 г. – Новосибирск, 2010. – Ч.1. – С. 12–15.

6. Бахметьева-Тюнина О.И. Воздействие оксида углерода (II) на некоторые физико-химические свойства лимфоцитов крови человека / О.И. Бахметьева-Тюнина, О.В. Путинцева, В.Г. Артюхов // Актуальные вопросы биологической физики и химии БФФХ-2012. Материалы международной VIII научно-технической конференции г. Севастополь: 23-27 апреля 2012 г. – Севастополь : СевНТУ, 2012. – С. 175–177.

7. Бахметьева-Тюнина О.И. Об адаптационных возможностях лимфоцитов крови человека в условиях воздействия оксида углерода (II) / О.И. Бахметьева-Тюнина, О.В. Путинцева, В.Г. Артюхов // Медико-биологические и педагогические основы адаптации, спортивной деятельности и здорового образа жизни. Сборник научных статей Всероссийской заочной научно-практической конференции с международным участием 25 апреля 2012 г. – Воронеж : Научная книга, 2012. – С. 240–241.

8. Бахметьева-Тюнина О.И. О нарушении CD95-опосредованного пути реализации апоптоза лимфоцитарных клеток человека под воздействием оксида углерода (II) / О.И. Бахметьева-Тюнина, О.В. Путинцева, В.Г. Артюхов // Биология – наука XXI века: 16-я Международная Пущинская школа-конференция молодых ученых (Пущино, 16–21 апреля, 2012 г.). Сборник тезисов, – Пущино, 2012. – С. 56–57.

9. Бахметьева-Тюнина О.И Уровень экспрессии CD95 рецепторов лимфоцитами

крови человека в условиях воздействия оксида углерода (II) / О.И. Бахметьева-Тюнина, О.В. Путинцева, В.Г. Артюхов // Материалы международной научно-практической конференции «Дни науки-2012 г.» – Ч. 76. Биологические науки. Химия и химическая технология. Прага : Образование и наука, 2012 – С. 24–25.

10. Бахметьева-Тюнина О.И. Комплексное воздействие оксида углерода (II) на Fas-рецепторы лимфоцитов крови человека / О.И. Бахметьева-Тюнина, О.В. Путинцева, В.Г. Артюхов // IV съезд биофизиков России. Симпозиум IV «Новые тенденции и методы в биофизике». Материалы докладов. – Нижний Новгород, 2012 – С. 35.

11. Бахметьева-Тюнина О.И. Влияние оксида углерода (II) на развитие программируемой клеточной гибели лимфоцитов крови человека / О.И. Бахметьева-Тюнина, О.В. Путинцева, В.Г. Артюхов // Материалы международной конференции «Биология – наука XXI века», Москва, 24 мая 2012 г. – Москва, 2012 – С. 94–96.

12. Тюнина О.И. Изучение воздействия монооксида углерода на параметры биохемилюминесценции лимфоцитов крови человека / О.И. Тюнина, О.В. Путинцева, В.Г. Артюхов // Научная дискуссия: вопросы математики, физики, химии, биологии: сборник статей по материалам XII международной заочной научно-практической конференции, Москва, 2013 – С. 66–70.

13. Артюхов В.Г. Токсическое влияние монооксида углерода на суспензии лимфоцитов и нарушение CD95-опосредованного пути реализации их апоптоза / В.Г. Артюхов, О.В. Путинцева, О.И. Бахметьева-Тюнина // Токсикологический вестник. – 2012. – №4. – С. 41–44.

14. Артюхов В.Г. Исследование структурно-функциональных признаков (индикаторов) апоптоза лимфоцитов крови человека в условиях воздействия монооксида углерода и ультрафиолетового (УФ)-света / В.Г. Артюхов, О.В. Путинцева, О.И. Бахметьева-Тюнина, С.М. Костенко, С.М. Дубова // Радиационная биология. Радиоэкология. – 2014. – Т. 54, №3. – С. 1–8.

Статьи **№ 1, 13 и 14** опубликованы в печатных изданиях, состоящих в списке журналов, рекомендованных ВАК РФ.