

**О.И. Тюнина**

## **АДАПТАЦИОННЫЕ ВОЗМОЖНОСТИ ЛИМФОЦИТОВ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА В УСЛОВИЯХ ВОЗДЕЙСТВИЯ МОНООКСИДА УГЛЕРОДА**

*Воронежский государственный университет, каф. биофизики и биотехнологии*

**Резюме.** Представлены результаты исследования уровня жизнеспособности лимфоцитов крови человека, экспрессии CD95 маркера на поверхности их мембран, а также электрофореза молекулы ДНК после инкубации клеток в атмосфере монооксида углерода (время экспозиции 60, 75 и 90 мин.) Выявлено, что монооксид углерода не вызывает гибели лимфоцитов по пути апоптоза, на что указывает уменьшение экспрессии CD95 рецепторов и отсутствие апоптозной лестницы молекулы ДНК иммунокомпетентных клеток.

**Ключевые слова:** лимфоциты, жизнеспособность, CD95 рецепторы, молекула ДНК, апоптоз.

**Актуальность.** Апоптоз играет центральную роль в реализации программ развития организма, в дифференцировке, удалении поврежденных клеток, а также в поддержании гомеостаза иммунной системы [7].

Программированная гибель клеток привлекает к себе внимание многочисленных исследователей, прежде всего, по двум причинам:

Во-первых, как оказалось, она играет важную роль в морфогенетических процессах и в регуляции численности клеток на протяжении всего онтогенетического развития многоклеточного организма.

Во-вторых, обнаружено, что возникновение многих тяжелых заболеваний связано с такими нарушениями программы клеточной гибели, при которых клетки либо перестают погибать, и тогда возможно возникновение опухолей, либо гибель захватывает избыточное число клеток, что в свою очередь приводит к патологической дегенерации тканей и органов.

Таким образом, проблема исследования молекулярных механизмов запрограммированной гибели клетки (апоптоза) стала в последние годы одной из самых трудных и актуальных проблем биологических наук [10].

Иммунная система, ответственная за поддержание антигенного постоянства, включает большое количество 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 действию на рецепторы.

В настоящее время активно исследуется роль монооксида углерода (оксида углерода (II), CO), признанного газовым посредником вслед за оксидом азота, в регуляции различных аспектов жизнедеятельности клетки. Монооксид углерода вовлечен в регуляцию тонуса сосудов и ангиогенеза, передачу импульсов в мозге, а также метаболизм ксенобиотиков в печеночной ткани. CO ингибирует провоспалительные сигнальные пути и способствует индукции антиинфламаторных и

антипролиферативных механизмов [5]. В норме в организме человека оксид углерода (II) образуется при деградации гемсодержащих соединений [4]. Сейчас доказано, что СО в низких концентрациях, наравне с NO, необходим для функционирования практически всех органов и тканей. Однако, несмотря на вышесказанное, на сегодняшний день остается нерешенным вопрос участия СО в молекулярных механизмах регуляции апоптоза клеток. Известно, что монооксид углерода обладает дуалистическим эффектом в отношении апоптотической реакции клеток. При этом конечный эффект воздействия газовых транскмиттеров на апоптоз определяется не только типом исследуемых клеток, а также концентрацией и временем воздействия на них [11].

В связи с этим нами были изучены эффекты действия монооксида углерода на структурно-функциональное состояние лимфоцитов крови человека.

**Материал и методы исследования.** Объектом исследования служили лимфоциты, полученные из гепаринизированной крови доноров методом седиментации (300 g, 15 мин) в градиенте плотности фиколл-урографина ( $\rho=1,077$  г/см<sup>3</sup>) по методу А. Воум [6].

Суспензию лимфоцитарных клеток помещали в атмосферу оксида углерода (II), который получали лабораторным способом по химической реакции между концентрированными серной и муравьиной кислотами в колбе с закрытой крышкой и газоотводной трубкой (соотношение 1:1) [2]. Модификация монооксидом углерода исследуемых клеток крови длилась 60, 75 и 90 мин.

Жизнеспособность лимфоцитов анализировали в тесте с красителем трипановым синим. Данный краситель проникает только через мембраны нежизнеспособных, поврежденных клеток и окрашивает их ядро [8]. 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:

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

Уровень экспрессии CD95 рецепторов на поверхности нативных и СО-модифицированных мембран лимфоцитов крови человека ( $2 \times 10^6$  кл/мл) определяли на проточном цитофлуориметре «EPICS XL-MCL» («Beckman coulter», США) на базе ГУЗ «Воронежский областной центр по профилактике и борьбе со СПИДом и инфекционными заболеваниями». В работе использовали моноклональные антитела CD95, меченные FITC (Fluorescein Isothiocyanate) и соответствующие изотипические контроли («Beckman coulter», США).

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

Изменения структуры ДНК иммуноцитов анализировали с помощью метода электрофореза в 2% агарозном геле с использованием ТАЕ-буфера (pH=8) [9]. Размеры фрагментов ДНК иммунокомпетентных клеток при проведении электрофореза в агарозном геле определяли с помощью Mass Rullertm 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.

Статистическую обработку результатов экспериментов проводили с помощью прикладной программы Microsoft Excel.

**Полученные результаты и их обсуждение.** 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.) при 37 0С. (Табл. 1).

Показано, что уровень жизнеспособности лимфоцитов, подвергшихся инкубации в атмосфере монооксида углерода в течение 90 мин., статистически значимо уменьшался до 85,7±5,8%. Таким образом, доля погибших клеток после 90-мин. экспозиции в атмосфере оксида углерода (II) составила 12,3 %. 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).

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

**Таблица 1.**

**Уровень жизнеспособности СО-модифицированных лимфоцитарных клеток человека до и после их суточного термостатирования**

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

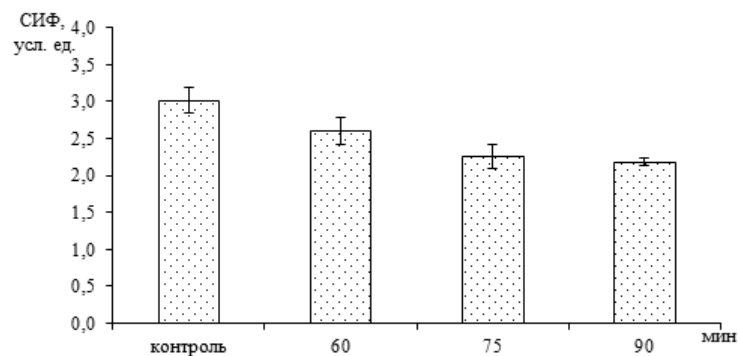
\* – отклонения исследуемого показателя относительно контроля статистически значимы

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

Ранее нами был исследован уровень экспрессии CD95 рецепторов на поверхности иммунокомпетентных клеток методом иммуноферментного анализа (ИФА) [1]. Результаты по исследованию экспрессии CD95 маркеров на поверхности мембран СО-модифицированных иммуноцитов (время экспозиции – 60, 75 и 90 мин.) методом проточной цитофлуориметрии позволили выявить сходные тенденции изменения их экспрессии, полученные нами методом ИФА, что дает возможность с большей убедительностью говорить о наблюдаемых нами эффектах.

Выявлено, что содержание CD95<sup>+</sup>-клеток составляло 36,0±3,1%, а их средняя интенсивность флуоресценции (СИФ) – 3,0±0,2 усл. ед.

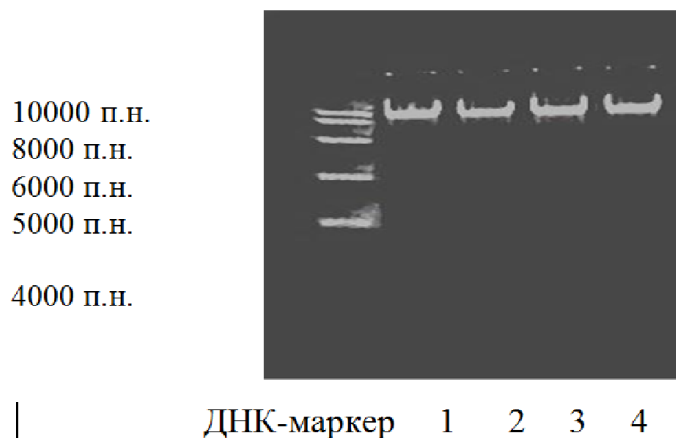
После воздействия на смесь иммуноцитов монооксида углерода в течение 60, 75 и 90 мин. СИФ клеток понижалась соответственно на 13,6; 25,2 и 27,5% (Рис. 1).



**Рис. 1. Величины средней интенсивности флуоресценции CD95 маркеров на поверхности лимфоцитов крови человека, модифицированных монооксидом углерода (60, 75 и 90 мин.)**

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. 2, показал, что на электрофоретической дорожке 1 (контроль), выявляется одна полоса, соответствующая высокомолекулярной ДНК нативных клеток.



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

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.

Таким образом, адаптационные возможности лимфоцитов к воздействию CO, связанные с их компенсаторными механизмами защиты, ограничиваются достаточно продолжительным временем пребывания (до 75 мин.) в атмосфере монооксида углерода. После инкубации образцов иммуноцитов в атмосфере CO, возможно, могут возникать 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]. В результате проведенного исследования не выявлено фрагментации молекулы ДНК после инкубации лимфоцитов крови человека в атмосфере оксида углерода (II) (время экспозиции 60, 75 и 90 мин.), что доказывает отсутствие развития программируемой клеточной гибели лимфоидных клеток в исследуемых условиях.

Полученные нами результаты работы могут быть полезны при обсуждении вопросов, связанных с изучением процессов дизрегуляции апоптоза после воздействия монооксида на клетки крови человека.

#### *Литература.*

1. 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.
2. Грандберг И.И. Органическая химия / И.И. Грандберг. – Москва : Дрофа, 2002. – 672 с.
3. 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.
4. Загоскин П.П. Новые данные о физиологической роли монооксида углерода / П.П. Загоскин // Нижегородский Медицинский Журнал. – 2008. – № 3. – С. 103–110.
5. 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.
6. Кэтти Д. Антитела. Методы : в 2 кн. – Москва : Мир, 1991. – Кн. 2. – 380 с.
7. 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.
8. Новиков Д.К. Оценка иммунного статуса / Д.К. Новиков, В.И. Новикова. - Москва : Витебский мединститут, 1996. – 281 с.
9. Поляничко А.М. Электрофорез в агарозном геле / А.М. Поляничко. – Санкт-Петербург : Изд-во СПбГУ, 2007.– 42 с.
10. Скибо Ю.В. Методы исследования программируемой клеточной гибели / Ю.В. Скибо, З.И. Абрамова. – Казань : ФГАОУ ВПО КФУ, 2011. – 61 с.
11. Wu L. Carbon monoxide: Endogenous production, physiological functions, and pharmacological applications / L. Wu, R. Wang // Pharmacol Rev. – 2005. – Vol. 57, № 4. – P. 585–630.

**Abstract.**

**Тyunina O.I.**

**ADAPTATION POSSIBILITIES OF HUMAN BLOOD LYMPHOCYTES IN CONDITIONS OF CARBON MONOXIDE**

*Voronezh State University, Department of Biophysics and Biotechnology*

The results of viability studies level in human blood lymphocytes, expression of CD95 marker on their surface membranes, electrophoresis, and the DNA molecule after incubation in a carbon monoxide atmosphere (exposure time 60, 75i 90 min.) Revealed that carbon monoxide does not cause the death by apoptosis of lymphocytes as indicated by decreased expression of CD95 receptors and the absence of apoptotic ladder DNA molecule of immunocompetent cells.

**Keywords:** lymphocytes, viability, CD95 receptor DNA molecule, apoptosis.

**References:**

1. Artjuhov V.G. Toksicheskoe vliyanie monooksida ugljeroda na suspenzii limfocitov i narushenie CD95-oposredovannogo puti realizacii ih apoptoza / V.G. Artjuhov, O.V. Putinceva, O.I. Bahmet'eva-Tjunina // Toksikologicheskij vestnik. – 2012. – №4. – S. 41–44. [in Russia].
2. Grandberg I.I. Organicheskaja himija / I.I. Grandberg. – Moskva : Drofa, 2002. – 672 s. [in Russia].
3. Dubova S.M. O mehanizme modulirujushhego dejstvija UF-sveta na sostojanie antigenogo profilja membran T-limfocitov krovi cheloveka / S.M. Dubova, O.V. Putinceva, V.G. Artjuhov // Vestnik VGU. Serija : Himija. Biologija. Farmacija. – 2010. – № 1. – S.76–81. [in Russia].
4. Zagoskin P.P. Novye dannye o fiziologicheskoj roli monooksida ugljeroda / P.P. Zagoskin // Nizhegorodskij Medicinskij Zhurnal. – 2008. – № 3. – S. 103–110. [in Russia].
5. Korzhov V.I. Monooksid ugljeroda (obzor literatury) / V.I. Korzhov, A.V. Vidmachenko, M.V. Korzhov // Zhurnal AMN Ukrainy. – 2010. – T. 16, № 1. – S. 23–37. [in Russia].
6. Kjetti D. Antitela. Metody : v 2 kn. – Moskva : Mir, 1991. – Kn. 2. – 380 s. [in Russia].
7. Lavrik I.N. Reguljacija apoptoza, inducirovannogo cherez CD95/Fas i drugie «receptory smerti» / I.N. Lavrik // Molekuljarnaja biologija. – 2011. – T. 45, № 1. – S. 173–179. [in Russia].
8. Novikov D.K. Ocenka immunnogo statusa / D.K. Novikov, V.I. Novikova. - Moskva : Vitebskij medinstitut, 1996. – 281 s. [in Russia].
9. Poljanichko A.M. Jelektroforez v agaroznom gele / A.M. Poljanichko. – Sankt-Peterburg : Izd-vo SPbGU, 2007.– 42 s. [in Russia].
10. Skibo Ju.V. Metody issledovanija programmiruemoj kletочноj gibeli / Ju.V. Skibo, Z.I. Abramova. – Kazan' : FGAOU VPO KFU, 2011. – 61 s. [in Russia].
11. Wu L. Carbon monoxide: Endogenous production, physiological functions, and pharmacological applications / L. Wu, R. Wang // Pharmacol Rev. – 2005. – Vol. 57, № 4. – R. 585–630.