

## ПУТИ РЕАЛИЗАЦИИ АПОПТОЗА ЛИМФОЦИТОВ ЧЕЛОВЕКА, ИНДУЦИРОВАННОГО ПЕРОКСИДОМ ВОДОРОДА, И ИХ РЕГУЛИРОВАНИЕ

Наквасина М.А., Артюхов В.Г., Старикова Т.И., Сараджи Н.Г.

Воронежский государственный университет

Университетская пл., 1, г. Воронеж, 394006, РФ; e-mail: nakvasina\_ma@mail.ru

Поступила в редакцию 22.07.2022. DOI: 10.29039/rusjbpс.2022.0541

**Аннотация.** В работе изучены изменения маркерных показателей апоптотической гибели клеток: уровня функциональной активности инициирующих каспаз-8, -9, -12, мембранных рецепторов смерти Fas, внутриклеточных активных форм кислорода, цитозольного кальция, митохондриального потенциала лимфоцитов периферической крови доноров, индуцированные воздействием пероксида водорода в конечных концентрациях  $10^{-6}$  и  $10^{-5}$  моль/л. Обнаружена активация инициирующей каспазы-8, ассоциированной с мембранными рецепторами смерти Fas, после воздействия на лимфоциты пероксида водорода в концентрации  $10^{-6}$  моль/л. Выявлено значительное повышение функциональной активности инициирующей каспазы-9, уровня Fas-рецепторов и внутриклеточных активных форм кислорода, а также снижение концентрации цитозольного кальция и величины мембранного потенциала митохондрий через 1 и 2 ч после модификации клеток пероксидом водорода в концентрации  $10^{-5}$  моль/л по сравнению с таковыми для интактных иммуноцитов. Установлено, что апоптоз лимфоцитов в условиях воздействия экзогенного пероксида водорода реализуется с участием рецепторопосредованного каспазного, митохондриального (с активацией каспазы-9) и p53-зависимого механизмов. Выявлено защитное действие ресвератрола ( $10^{-6}$  моль/л) на лимфоциты после воздействия пероксида водорода ( $10^{-5}$  моль/л), которое обусловлено его способностью снижать уровень активных форм кислорода в интактных и модифицированных пероксидом водорода иммуноцитах, а также дезактивировать пероксид водорода.

**Ключевые слова:** апоптоз, лимфоциты, пероксид водорода, каспазы.

Изучение механизмов и способов регулирования запрограммированной клеточной смерти — одна из ключевых проблем биофизики клетки, физико-химической биологии и биомедицины [1-3].

В настоящее время сложилось представление о свободнорадикальном механизме инициации апоптоза в различных типах клеток [2-6]. Установлена взаимосвязь между образованием в клетках (или воздействием на клетки) активных форм кислорода (АФК) и активированных кислородных метаболитов и индукцией в них апоптоза. АФК участвуют в запуске апоптоза путем инициации митохондриального механизма, увеличения концентрации внутриклеточного кальция, образования цАМФ, окисления ДНК с последующей активацией p53, окисления фосфатидилсерина плазматической мембраны и инактивации скрамблазы, усиления фосфорилирования белков, приводящего к изменению регуляции экспрессии генов.

Наиболее стабильной из АФК – редокс-активных молекул – является пероксид водорода. В зависимости от концентрации пероксид водорода способен стимулировать пролиферацию, вызывать задержку роста клеток и индуцировать апоптоз [6,7]. Окончательно не решены вопросы о концентрационной границе между сигнальным и токсическим действием пероксида водорода, а также о пути гибели клеток в условиях оксидативного стресса.

Ранее нами была исследована динамика маркерных показателей (индикаторов) апоптоза в лимфоцитах периферической крови человека в условиях воздействия пероксида водорода в концентрации  $10^{-6}$  моль/л [8-11]. Установлено, что после 20 часов инкубации лимфоцитов, модифицированных воздействием  $H_2O_2$ , происходит образование фрагментов ДНК, размеры которых составляют 1500-4000 п. н. Обработка клеток  $H_2O_2$  через 4 и 6 ч приводила к статистически значимому повышению количества фосфатидилсерин-позитивных клеток по отношению к таковому для интактных лимфоцитов. В течение 1-5 ч после воздействия  $H_2O_2$  на клетки наблюдалось повышение уровня экспрессии мембранных рецепторов смерти – Fas (CD95) – по сравнению с таковым для интактных клеток, обусловленное демаскированием ранее скрытых (предсуществующих) и синтезом новых молекул Fas. Через 4 ч после воздействия пероксида водорода на лимфоциты регистрировали значительный рост величины функциональной активности ведущей эффекторной каспазы-3 по отношению к таковой для интактных клеток. Обнаружено повышение по сравнению с контролем уровня транскрипционного фактора p53 в лимфоцитах через 6 ч после добавления к их суспензии раствора  $H_2O_2$ . Сразу после обработки лимфоцитов раствором пероксида водорода наблюдали образование ДНК-комет класса C1, через 6 и 20 ч инкубации модифицированных клеток соответственно – комет C2/C3 и C3/C4 классов. Наибольший объем повреждений ДНК приходился на время 6 ч после обработки лимфоцитов  $H_2O_2$ .

На основании анализа полученных результатов было сделано заключение о реализации в условиях воздействия пероксида водорода в концентрации  $10^{-6}$  моль/л на лимфоциты человека рецепторного каспазного и p53-зависимого пути ядерного механизмов апоптоза. В то же время не было получено убедительных доказательств участия митохондриального механизма в процессах осуществления запрограммированной клеточной смерти лимфоцитов. Представлялось актуальным исследование возможности реализации путей

апоптоза лимфоцитов, связанных с нарушением уровня вторичного мессенджера – цитозольного кальция. Также необходимо было изучить некоторые маркерные показатели апоптоза лимфоцитов в условиях воздействия пероксида водорода в более широком диапазоне концентраций ( $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$  моль/л).

В этой связи нами были исследованы изменения уровня функциональной активности иницирующих каспаз-8, -9, -12, мембранных рецепторов смерти Fas, внутриклеточных активных форм кислорода, цитозольного кальция, митохондриального потенциала лимфоцитов периферической крови доноров, индуцированные воздействием пероксида водорода.

В качестве объекта исследования использовали лимфоциты, полученные не позднее двух часов после забора крови. Забор крови производили в стеклянные центрифужные пробирки с добавлением раствора гепарина (25 ед./мл). Донорами были здоровые мужчины 18-45 лет, у которых брали кровь в филиале Воронежской городской клинической больницы скорой медицинской помощи № 1 БУЗ ВО Воронежской областной станции переливания крови.

Лимфоциты получали путем центрифугирования гепаринизированной донорской крови в градиенте плотности фиколл-урографина ( $\rho=1,077$  г/см<sup>3</sup>) [12]. Число жизнеспособных клеток во взвешях определяли методом эксклюзии трипанового синего [12].

Лимфоциты модифицировали пероксидом водорода в конечных концентрациях  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$  моль/л и инкубировали в течение 1, 2, 3 ч при температуре 37 °С. Растворы пероксида водорода готовили с использованием молярного коэффициента поглощения  $H_2O_2 - 43,6$  л·моль<sup>-1</sup>·см<sup>-1</sup> при длине волны 240 нм.

Функциональную активность каспаз-8, -9, -12 в нативных и модифицированных лимфоцитах определяли с помощью люминесцентного метода [13] на спектрофлуориметре Shimadzu RF-1501 в соответствии с протоколами фирм-производителей используемых флуоресцентных субстратов: для каспазы-8 – acetyl-isoleucyl-glutamyl-threonyl-aspartyl-7-amino-4-trifluoromethylcoumarin (Ac-IETD-AFC, «Biovision», США), для каспазы-9 – acetyl-leucine-glutamic acid-histidine-aspartic acid-7-amino-4-trifluoromethylcoumarin (Ac-LEHD-AFC, Abcam, США), для каспазы 12 – acetyl-alanyl-threonyl-alanyl-aspartyl-7-amino-4-trifluoromethylcoumarin (Ac-ATAD-AFC, «Biovision», США).

Уровень экспрессии CD95 на поверхности лимфоцитов определяли с помощью набора FITC Mouse Anti-Human CD95 («BD Pharmingen™», США) на проточном цитометре Guava Easy Cyte 8HT (Merck Millipore), обработку данных проводили при помощи программы In Cyte.

Концентрацию свободного цитоплазматического кальция в лимфоцитах измеряли с использованием флуоресцентного зонда Fura-2AM на спектрофлуорофотометре Shimadzu RF-1501 [14].

Уровень активных форм кислорода (АФК) в интактных и модифицированных лимфоцитах исследовали флуоресцентным методом при помощи 2',7'-дихлорфлуоресцеиндиацетата (DCFH-DA) на спектрофлуорофотометре Shimadzu RF-1501 [15].

Регистрацию уровня мембранного потенциала митохондрий осуществляли с помощью флуоресцентного зонда – родамина 123 («Fluka», Германия) на спектрофлуорофотометре Shimadzu RF-1501 [16].

Антирадикальную активность ресвератрола регистрировали по изменению интенсивности хемилюминесценции люминола на биохемилюминометре БХЛ-07.

Обработку результатов проводили с помощью пакета статистических программ Stadia: определяли среднее значение, стандартное отклонение, доверительный интервал сравниваемых показателей. Достоверность отличий контрольных и экспериментальных результатов оценивали при помощи *t*-критерия Стьюдента.

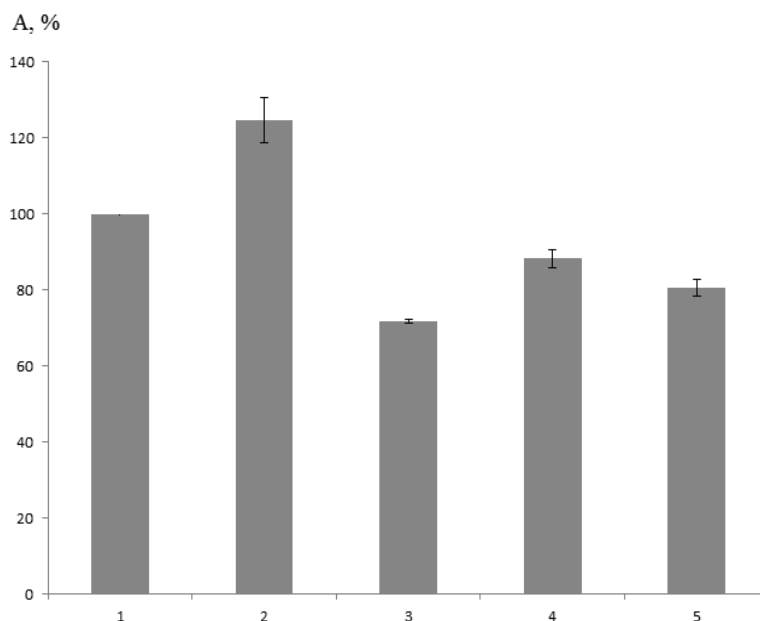
Классическая иницирующая каспаза-8 передает сигнал от рецепторов смерти на ведущую эффекторную каспазу-3 и выполняет регуляторную роль в рецепторзависимой передаче сигналов апоптоза [2,3,17,18].

На рисунке 1 представлены результаты определения уровня активности каспазы-8 сразу после добавления к суспензии лимфоцитов пероксида водорода в конечной концентрации  $10^{-6}$  моль/л и через 1, 2, 3 ч после модификации клеток. За 100% принята активность каспазы-8 инкубированных соответственно в течение 1-3 ч нативных клеток. Статистически достоверное повышение уровня функциональной активности каспазы-8 по отношению к контролю обнаружено сразу после модификации клеток  $H_2O_2$ . Через 1, 2 и 3 ч после воздействия на иммунциты пероксида водорода зафиксировано статистически значимое снижение уровня исследуемого параметра соответственно на 28, 12 и 19% по отношению к величине такового для нативных лимфоцитов. Следовательно, нами обнаружено, что добавление  $H_2O_2$  ( $10^{-6}$  моль/л) к суспензии лимфоцитарных клеток индуцирует активацию иницирующей каспазы-8, ассоциированной с рецепторами смерти Fas. Снижение величины активности каспазы-8 по сравнению с таковой нативных иммунцитов через 1, 2 и 3 ч после воздействия пероксида водорода на лимфоциты может быть связано с ее ингибированием IAP (Inhibitors of Apoptosis), A1/Bfl1 (членом семейства белков Bcl-2), FLIP (FADD-like inhibitory protein) либо с активацией других путей апоптоза.

Механизм апоптоза, запускающийся при стрессе эндоплазматического ретикула, реализуется несколькими путями [2,3], что можно показать в виде схем 1 и 2.

Схема 1: стресс ЭПР (нарушения процессов сворачивания, укладки, гликозилирования белков и их транспорта к аппарату Гольджи) → сенсор состояния ЭПР — белок IRE-1 $\alpha$  → JNK-киназа → активация белка TRAF-2 → активация прокаспазы-12 → каспаза-12 → активация прокаспазы-9 → каспаза-9 → прокаспаза-3 → каспаза-3 → самоуничтожение клетки.

Схема 2: взаимодействие белка IRE-1 $\alpha$  с проапоптозными Bax и Bak → формирование пор в мембране ЭПР → выход Ca<sup>2+</sup> из ЭПР в цитозоль → активация m-кальпаина → активация прокаспазы-12 → каспаза-12 → ... → самоуничтожение клетки.



**Рисунок 1.** Изменения уровня функциональной активности (А) каспазы-8 лимфоцитов человека после воздействия на клетки пероксида водорода ( $10^{-6}$  моль/л) и инкубации модифицированного образца. Обозначения: 1 – активность каспазы-8 интактных лимфоцитов (100%); 2, 3, 4, 5 – активность каспазы-8 лимфоцитов соответственно сразу и через 1, 2, 3 ч после воздействия пероксида водорода

Иницирующая каспаза-12 участвует в функционировании сигнального каскада, реализующегося при нарушениях гомеостаза кальция, фолдинга белков и их накоплении в ЭПР, гипоксии, гипогликемии [2,3]. Данные о функционировании каспазы-12 в клетках человека противоречивы. Полагают [2], что у человека в гене каспазы-12 присутствует делеция, в результате чего этот белок не экспрессируется, либо образуется в укороченной форме и не обладает ферментативной активностью, а его функцию выполняет каспаза-4. В то же время активация каспазы-12 в условиях апоптоза была показана и для клеток человека [19].

При исследовании изменений уровня активности каспазы-12 лимфоцитов после их модификации пероксидом водорода в концентрации  $10^{-6}$  моль/л и через 1, 2 и 3 ч не обнаружены статистически значимые отличия величин исследуемого параметра от таковых для нативных иммунцитов. Вероятно, в этих условиях путь апоптоза, связанный со стрессом эндоплазматического ретикулума и каспазой-12, не функционирует, а передача апоптозного сигнала идет по другим путям.

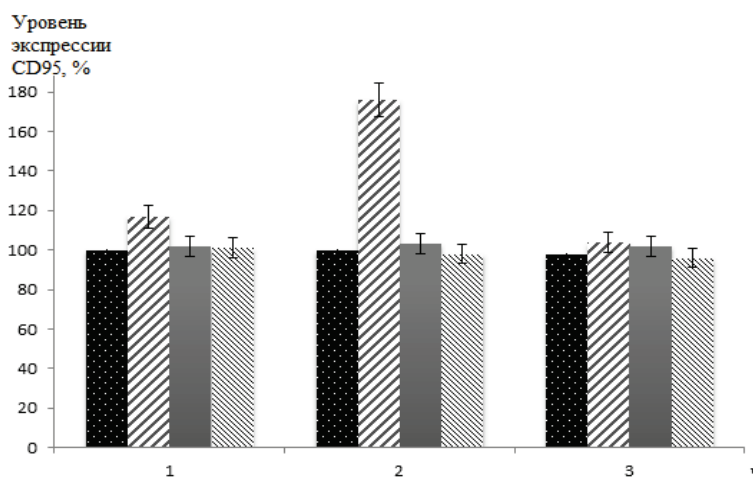
Рецепторный (рецепторопосредованный) механизм апоптоза реализуется по следующей схеме [18]: проапоптотический лиганд смерти CD95L (мембранная форма) → рецептор смерти CD95 (Fas) в олигомерном (тримеризованном) состоянии → адаптер FADD → иницирующая прокаспаза -8 или -10 → активная каспаза -8 или -10 → эффекторная прокаспаза-3 → активная каспаза-3 → белки-мишени (в т.ч. ингибитор ДНКазы) → расщепление клеточных белков, активация ДНКазы и «разрезание» ДНК на фрагменты.

Нами с использованием проточно-цитометрического метода был исследован уровень экспрессии CD95 лимфоцитов через 1, 2, 3 ч после добавления  $H_2O_2$  в концентрациях  $10^{-5}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-3}$  моль/л (рис. 2). За 100% принят уровень экспрессии CD95 нативных клеток, инкубированных в течение 1, 2 и 3 ч при 37 °С. Выявлено, что пероксид водорода в концентрации  $10^{-5}$  моль/л вызывает статистически достоверное повышение уровня экспрессии CD95 лимфоцитов через 1 ч на 17% и через 2 ч на 76% по отношению к таковому для интактных клеток (100%). После воздействия пероксида водорода в концентрациях  $10^{-4}$  и  $10^{-3}$  моль/л и инкубации в течение 1, 2, 3 ч не обнаружены статистически значимые изменения уровня экспрессии CD95 по сравнению с таковым для интактных лимфоцитов.

Полученные данные свидетельствуют в пользу представления о том, что  $H_2O_2$  в концентрации  $10^{-5}$  моль/л индуцирует Fas-зависимый путь апоптоза.

В дальнейших экспериментах мы модифицировали лимфоциты пероксидом водорода в конечной концентрации  $10^{-5}$  моль/л.

Митохондриальный механизм апоптоза связан с выходом апоптогенных факторов из митохондрий в цитоплазму [2,3,18]. Он реализуется по следующей схеме: индукторы апоптоза → увеличение проницаемости внутренней митохондриальной мембраны и снижение мембранного потенциала → образование (открытие) пор (каналов) в митохондриальной мембране с участием проапоптотических белков семейства Bcl-2 (Bax, Bak, Bad и др.) → высвобождение из межмембранного пространства митохондрий в цитоплазму апоптогенных факторов (цитохрома с, прокаспаз -2, -3, -9, эндонуклеазы G и фактора, индуцирующего апоптоз, - AIF) → образование в цитоплазме апоптосомы с участием цитохрома с, цитоплазматического фактора APAF-1, иницирующей прокаспазы-9 и АТФ → активная каспаза-9 → прокаспазы -3, -6, -7 → активация эффекторных каспаз -3, -6, -7 → расщепление белков-мишеней и фрагментация ДНК.



**Рисунок 2.** Уровень экспрессии CD95 лимфоцитов после воздействия пероксида водорода.

Обозначения:

■ — контроль;

▨ — лимфоциты +  $H_2O_2$  ( $10^{-5}$  моль/л);

■ — лимфоциты +  $H_2O_2$  ( $10^{-4}$  моль/л);

▩ — лимфоциты +  $H_2O_2$  ( $10^{-3}$  моль/л).

Нами обнаружено существенное повышение в 2,6 раза по сравнению с контролем (интактные иммунциты) активности, инициирующей каспазы-9, участвующей в запуске митохондриального каспазного пути апоптоза через 1 и 2 ч после модификации лимфоцитов  $H_2O_2$  ( $10^{-5}$  моль/л).

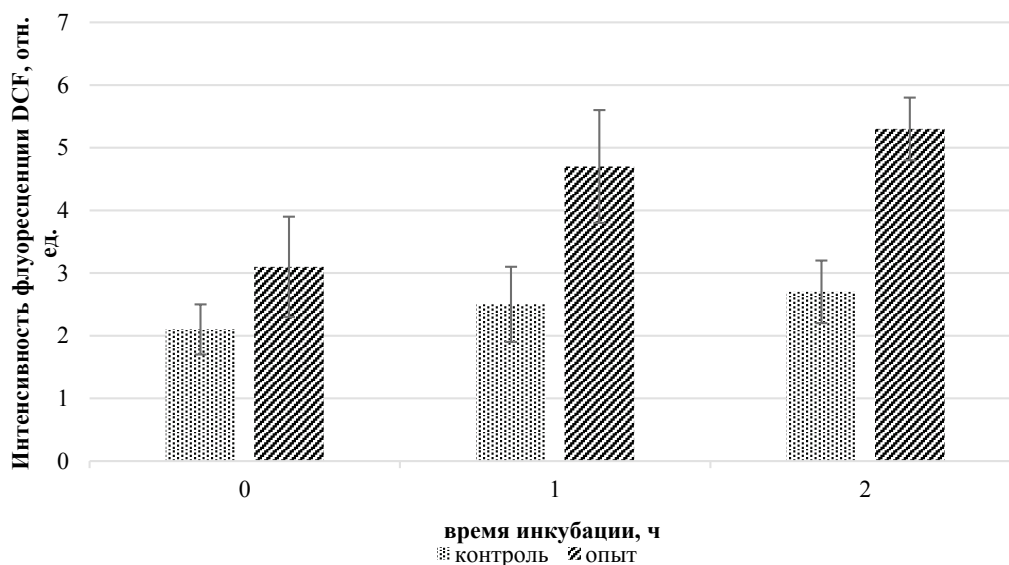
Выявлено статистически значимое повышение уровня внутриклеточных активных форм кислорода через 1 и 2 ч. после модификации лимфоцитов  $H_2O_2$  ( $10^{-5}$  моль/л) по сравнению с таковым для интактных клеток (рис. 3). Стимуляция образования активных кислородных метаболитов в клетках в условиях воздействия индуцирующих активных форм кислорода называется феноменом АФК-индуцированного образования АФК. Небольшие количества индуцирующих АФК вызывают падение трансмембранного потенциала митохондрий и генерацию вторичных активных форм кислорода, что приводит к развитию «окислительного взрыва». В ходе АФК-индуцированного образования АФК происходит окисление белков и регуляторных тиолов, которые изменяют редокс-статус клеток, инициируя неспецифическую проницаемость мембран митохондрий: происходит нарушение функционирования электрон-транспортной цепи и изменение свойств митохондриальной мембраны.

Воздействие пероксида водорода в той же концентрации на лимфоциты индуцировало сначала повышение уровня цитозольного кальция до  $150 \pm 18$  нмоль/л по отношению к таковому для интактных клеток ( $81 \pm 15$  нмоль/л); через 1 и 3 часа – снижение соответственно до  $45 \pm 8$  и  $34 \pm 10$  нмоль/л по сравнению с таковым для нативных иммунцитов ( $67 \pm 10$  и  $59 \pm 8$  нмоль/л). Возможно, в клетках в этих условиях происходят процессы перераспределения ионов кальция между клеточными компартментами – цитозолем, митохондриями и ядром. Захват цитозольного кальция митохондриями способствует инициации митохондриального механизма апоптоза [2,3,18].

Обнаружено статистически значимое снижение на 32% интенсивности флуоресценции «митохондриального» флуоресцентного зонда – родамина 123 – по сравнению с таковой для нативных клеток (100%) для лимфоцитов через 1 ч после модификации пероксидом водорода, что является показателем нарушения функционального состояния митохондрий.

Активация инициирующей каспазы-9, увеличение концентрации в цитоплазме активных форм кислорода, нарушение мембранного потенциала митохондрий, изменения уровня цитозольного кальция после воздействия на лимфоциты пероксида водорода ( $10^{-5}$  моль/л) являются маркерами митохондриального механизма апоптоза, реализующегося с участием каспазы-9.

В настоящее время внимание исследователей привлекает проблема взаимосвязи процессов апоптоза, клеточного старения и функционирования теломеразы [3]. Укорочение теломерных повторов до критических величин вследствие концевой недорепликации ДНК вызывает прекращение деления клеток, дестабилизацию и потерю функций теломер, хромосомные нарушения. В результате активируется система ответа клетки на повреждения ДНК и запускается апоптоз. Укороченные теломеры обнаруживаются при окислительном стрессе. Укорочению хромосом в процессе репликации препятствует теломераза, удлиняющая 3'-выступающие концы ДНК путем добавления теломерных повторов. К активаторам теломеразы относят ресвератрол. Это соединение фенольной природы, обладающее антиканцерогенными, гепатопротекторными и противовоспалительными свойствами. Возможное модулирующее действие ресвератрола на структурно-функциональное состояние лимфоцитов человека и процессы их гибели исследовано недостаточно.



**Рисунок 3.** Изменения уровня активных форм кислорода в цитозоле лимфоцитов после воздействия пероксида водорода в концентрации  $10^{-5}$  моль/л

Нами выявлено защитное действие транс-ресвератрола (Shaanxi Hongao Bio-Tech Inc., Китай) в концентрации  $10^{-6}$  моль/л по отношению к уровню жизнеспособности лимфоцитов после воздействия пероксида водорода ( $10^{-5}$  моль/л). Предварительная инкубация лимфоцитов с ресвератролом индуцировала снижение на 37 и 47% уровня АФК в цитозоле модифицированных  $H_2O_2$  и интактных клеток соответственно по отношению к таковому для иммуноцитов в отсутствие ресвератрола. С помощью метода хемилуминолзависимой люминесценции в модельной системе обнаружена антирадикальная активность ресвератрола по отношению к пероксиду водорода: интенсивность люминесценции в отсутствие ресвератрола составляла  $2900 \pm 20$  отн. ед., а в его присутствии -  $172 \pm 20$  отн. ед. В условиях генерации гидроксильного радикала по механизму Фентона интенсивность люминесценции люминола в присутствии ресвератрола повышалась по отношению к величине исследуемого параметра в отсутствие ресвератрола, т.е. ресвератрол не проявлял антирадикальную активность в отношении гидроксильного радикала. Следовательно, ресвератрол является регулятором процессов апоптотической гибели лимфоцитов, связанных с воздействием экзогенного пероксида водорода и интенсификацией образования активных кислородных метаболитов.

Обобщая настоящие и ранее полученные нами результаты, можно заключить, что экзогенный пероксид водорода в конечной концентрации 1 и 10 мкмоль индуцирует в лимфоцитах периферической крови доноров процессы апоптотической гибели, которые реализуются с участием рецепторопосредованного каспазного, митохондриального (с активацией каспазы-9) и p53-зависимого пути ядерных механизмов апоптоза. Причем митохондриальный механизм с участием каспазы-9 является «быстродействующим», а его медиаторы – активные формы кислорода и ионы кальция. Следовательно, системы генерации активных форм кислорода и пути перераспределения свободных ионов кальция между клеточными компартментами могут выступать в качестве «сайтов» регулирования  $H_2O_2$ -индуцированного апоптоза лимфоцитарных клеток.

*Работа выполнена при поддержке Министерства науки и высшего образования РФ в рамках государственного задания ВУЗам в сфере научной деятельности на 2020—2022 годы, проект № FZGU-2020-0044.*

#### **Список литературы / References:**

1. Nagata S., Masato Tanaka. Programmed cell death and the immune system. *Nature Reviews Immunology*, 2017, vol. 17, no. 5, pp. 333-340, doi: 10.1038/nri.2016.153.
2. Savitskaya M.A., Onishchenko G.E. Mechanisms of Apoptosis. *Biochemistry (Mosc.)*, 2015, vol. 80, no. 11, pp. 1393-1405, doi: 10.1134/S0006297915110012.
3. Наквасина М.А., Артюхов В.Г. *Механизмы клеточной гибели: апоптоз, аутофагия, некроз. Учебное пособие.* Воронеж: Издательский дом ВГУ, 2019, 164 с. [Nakvasina M.A., Artyukhov V.G. *Mechanisms of cell death: apoptosis, autophagy, necrosis. Textbook.* Voronezh: VSU Publishing House, 2019, 164 p. (In Russ.)]
4. Mates J.M., Sanchez-Jimenez F.M. Role of reactive oxygen species in apoptosis: implications for cancer therapy. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 2000, vol. 32, pp. 157-170, doi: 10.1016/s1357-2725(99)00088-6.

5. Riazantseva N.V., Novitskii V.V., Chasovskikh N.Iu., Kaigorodova E.V., Starikova E.G., Starikov Iu.V., Radzivil T.T., Krat N.V. The role of redox-dependent signal systems in the regulation of apoptosis under oxidative stress condition. *Tsitologiya*, 2009, vol. 51, no. 4, pp. 329-334. (In Russ.)
6. Cherenkevich S.N., Martinovich G.G., Martinovich I.V., Gorudko I.V., Shamova E.V. Redox regulation of cellular activity: concepts and mechanisms. *Vesci NAN Belarusi. Ser. biyal. Navuk*, 2013, vol. 1, pp. 92-108. (In Russ.)
7. Nadeev A.D., Zinchenko V.P., Kudryavtsev I.V., Serebriakova M.K., Avdonin P.V., Goncharov N.V. Dual proapoptotic and pronecrotic effect of hydrogen peroxide on human umbilical vein endothelial cells. *Cell and Tissue Biology*, 2015, vol. 57, no. 12, pp. 909-916, doi: 10.1134/S1990519X16020097.
8. Artyukhov V.G., Trubitsyna M.S., Nakvasina M.A., Solov'eva E.V., Lidokhova O.V. Ways of realizing apoptosis of human lymphocytes induced by UV-light and reactive oxygen species. *Radiats Biol Radioecol*, 2011, vol. 51, no. 4, pp. 425-443. (In Russ.)
9. Artyukhov V.G., Trubitsyna M.S., Nakvasina M.A., Solov'eva E.V. DNA Fragmentation of Human Lymphocytes in Dynamics of Development of Apoptosis Induced by Action of UV Radiation and Reactive Oxygen Species. *Cell and Tissue Biology*, 2011, vol. 5, no. 2, pp. 127-135, doi: 10.1134/S1990519X11020039.
10. Artyukhov V.G., Trubitsyna M.S., Nakvasina M.A., Lidokhova O.V., Ryazantsev S.V. The ways for realization of human lymphocyte apoptosis, induced by hydrogen peroxide. *Voprosy biologicheskoy, medicinskoj i farmacevticheskoy himii*, 2013, no. 7, pp. 7-16. (In Russ.)
11. Nakvasina M.A., Popova L.I., Lidokhova O.V., Artyukhov V.G. Modulation of Structural and Functional Properties of Human Lymphocytes by Reactive Oxygen Species. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, 2019, vol. 166, no. 4, pp. 481-486, doi: 10.1007/S10517-019-04377-4.
12. Клаус Дж. *Лимфоциты. Методы*. Москва, Мир, 1990, 395 с. [Klaus J. *Lymphocytes. Methods*. Moscow, Mir, 1990, 395 p. (In Russ.)]
13. Kaufmann S., Lee Sun-Hee, Meng X., Loegering D., Kottke T., Heinzing A.J., Ruchaud S., Samejima K., Earnshaw W. Apoptosis-associated caspase activation assays. *Methods*, 2008, vol. 44, pp. 262-272, doi: 10.1016/j.ymeth.2007.11.005.
14. Hirst R.A., Harrison C., Hirota K., Lambert D.G. Measurement of  $[Ca^{2+}]_i$  in whole cell suspensions using fura-2. *Methods Mol. Biol.*, 2005, vol. 312, pp. 37-45, doi: 10.1385/1-59259-949-4:037.
15. Rastogi R.P., Singh S.P., Hader D.P., Sinha R.P. Detection of reactive oxygen species (ROS) by the oxidant-sensing probe 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate in the cyanobacterium *Anabaena variabilis* PCC 7937. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2010, vol. 397, no. 3, pp. 603-607, doi: 10.1016/j.bbrc.2010.06.006.
16. Kudryavtsev I.V., Golovkin A.S., Zurochka A.V., Khaidukov S.V. Modern technologies and approaches to apoptosis studies in experimental biology. *Medicinskaya immunologiya*, 2012, vol. 14, no. 6, pp. 461-482. (In Russ.)
17. Julien O., Wells I.A. Caspases and their substrates. *Cell Death and Differentiation. Advance online publication*. 2017, doi: 10/1038/cdd.2017.44.
18. Green D.R., Llamas F. Cell death signaling. *Cold Spring Harb Perspect Biol.*, 2015, doi: 10.1101/cshperspect.a006080.
19. Szegezdi E., Fitzgerald U., Samali A. Caspase-12 and ER-stress-mediated apoptosis: The story so far. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 2003, dec., vol. 1010, pp. 186-194, doi: 10.1196/annals.1299.032.

## WAYS OF REALIZATION OF APOPTOSIS OF HUMAN LYMPHOCYTES INDUCED BY HYDROGEN PEROXIDE AND THEIR REGULATION

Nakvasina M.A., Artyukhov V.G., Starikova T.I., Saradzhi N.G.

Voronezh State University

Universitetskaya pl., 1, Voronezh, 394006, Russia; e-mail: nakvasina\_ma@mail.ru

Received 22.07.2022. DOI: 10.29039/rusjbp.2022.0541

**Abstract.** The changes in marker indicators of apoptotic cell death were studied: the level of functional activity of initiating caspases-8, -9, -12, membrane death receptors Fas, intracellular reactive oxygen species, cytosolic calcium, mitochondrial potential of peripheral blood lymphocytes of donors induced by exposure to hydrogen peroxide at final concentrations of  $10^{-6}$  and  $10^{-5}$  mol/l. Activation of initiating caspase-8 associated with membrane death receptors Fas was detected after exposure to hydrogen peroxide lymphocytes at a concentration of  $10^{-6}$  mol/l. There was a significant increase in the functional activity of initiating caspase-9, the level of Fas receptors and intracellular reactive oxygen species, as well as a decrease in the concentration of cytosolic calcium and the value of the mitochondrial membrane potential 1 and 2 hours after modification of cells with hydrogen peroxide at a concentration of  $10^{-5}$  mol/l compared with those for intact immunocytes. It was found that apoptosis of lymphocytes under the influence of exogenous hydrogen peroxide is realized with the participation of receptor-mediated caspase, mitochondrial (with activation of caspase-9) and p53-dependent mechanisms. The protective effect of resveratrol ( $10^{-6}$  mol/l) on lymphocytes after exposure to hydrogen peroxide ( $10^{-5}$  mol/l), which is due to its ability to reduce the level of reactive oxygen species in intact and modified hydrogen peroxide immunocytes, as well as deactivate hydrogen peroxide.

**Key words:** apoptosis, lymphocytes, hydrogen peroxide, caspases.