

УДК 57.577.3

ЦИТОПРОТЕКТОРНОЕ И АНТИОКСИДАНТНОЕ ДЕЙСТВИЕ РЕСВЕРАТРОЛА НА ЛИМФОЦИТЫ ЧЕЛОВЕКА, МОДИФИЦИРОВАННЫЕ ПЕРОКСИДОМ ВОДОРОДА И УФ-СВЕТОМ

© 2024 г. М.А. Наквасина*, #, В.Г. Артюхов*, Е.Н. Чурсанова*, **, О.В. Мячина**, Е.И. Корпусова*, А.Ю. Деенкова*, В.А. Шестых*

*Воронежский государственный университет, Университетская пл., 1, Воронеж, 394018, Россия

**Воронежский государственный медицинский университет имени Н.Н. Бурденко Министерства здравоохранения Российской Федерации, ул. Студенческая, 10, Воронеж, 394036, Россия

#E-mail: nakvasina_ma@mail.ru

Поступила в редакцию 05.02.2024 г.

После доработки 14.03.2024 г.

Принята к публикации 08.05.2024 г.

Обнаружено снижение интенсивности процессов апоптотической и некротической гибели лимфоцитов периферической крови человека после воздействия УФ-света ($254\text{ нм}, 1510\text{ Дж}/\text{м}^2$) и пероксида водорода ($10^{-5}\text{ моль}/\text{л}$) в присутствии ресвератрола ($10^{-7}, 10^{-6}$ и $10^{-5}\text{ моль}/\text{л}$). Выявлено, что цитопротекторное действие ресвератрола на лимфоциты обусловлено снижением уровня продукции внутриклеточных активных форм кислорода и ионов кальция, повышением активности антиоксидантных ферментов — каталазы и глутатионредуктазы, увеличением пероксидной резистентности плазматических мембран, взаимодействием с ДНК. Обсуждаются возможные механизмы действия ресвератрола как регулятора процессов апоптотической и некротической гибели лимфоцитов, индуцированной воздействием пероксида водорода и УФ-излучения.

Ключевые слова: лимфоциты, ресвератрол, пероксид водорода, УФ-свет, апоптоз, некроз.

DOI: 10.31857/S0006302924060056, EDN: NLVEUG

Исследование механизмов, путей реализации и способов регулирования клеточной гибели иммunoцитов — одна из ключевых проблем клеточной биофизики и биомедицины. Нами выявлено [1, 2], что программируемая клеточная смерть лимфоцитов периферической крови человека после УФ-облучения ($240\text{--}390\text{ нм}$) в дозе $1510\text{ Дж}/\text{м}^2$ осуществляется с участием p53-зависимого пути ядерного механизма, а также рецепторопосредованного каспазного, митохондриального и связанного с нарушением кальциевого гомеостаза механизмов. Обнаружено [1, 2], что экзогенный пероксид водорода в конечной концентрации 1 и 10 мкмоль индуцирует в лимфоцитах процессы апоптотической гибели, которые реализуются с участием рецепторопосредованного каспазного, митохондриального (с активацией каспазы-9) и p53-зависимого пути ядерного механизма апоптоза. Медиаторами клеточной смерти лимфоцитов в условиях воздействия УФ-света и пероксида водорода являются активные формы кислорода (АФК) и ионы кальция. В этой связи

системы генерации и utilization АФК, мобилизации и перераспределения ионов кальция между клеточными компартментами можно рассматривать как одни из ключевых «сайтов» регулирования процессов клеточной гибели лимфоцитов.

Перспективным антиоксидантным биогенным соединением, проявляющим противовоспалительное, противомикробное, противоопухолевое, кардио- и нейропротективное, иммуномодулирующее, радиопротекторное действие, является ресвератрол [2–15]. Ресвератрол способен активировать теломеразу, влияет на посттрансляционную модификацию и локализацию фермента, ингибирует его активность в опухолевых клетках и увеличивает — в предшественниках эпителиальных и эндотелиальных клеток [16].

Ресвератрол — растительный полифенол, фитоалексин с эстрогеноподобным действием, существующий в виде *транс*- и *цис*-стереоизомеров [17]. *Транс*-ресвератрол представляет собой биологически активную и стабильную форму соединения. Ресвератрол имеет более двадцати молекулярных мишней, среди которых клеточные рецепторы, компоненты сигналтрансдукторных

Сокращение: АФК — активные формы кислорода.

систем, транскрипционные факторы, различные ферменты и др. [18].

Несмотря на то, что это плейотропное соединение проявляет множество положительных эффектов в исследованиях *in vitro* и *in vivo* и представляется перспективным для профилактики и лечения целого ряда патологий (в том числе онко-, сердечно-сосудистых и воспалительных заболеваний, диабета 2 типа, гипертонической болезни, метаболического синдрома), вопрос о его клиническом применении сложен в связи с низкой биодоступностью ресвератрола, двухфазностью его действия и определением оптимальной дозы препарата (биологически активного диапазона концентраций). Бифазный характер действия ресвератрола проявляется в антиоксидантном/цитопротективном/иммуностимулирующем/радиопротекторном эффекте при низких концентрациях (обычно менее 50 мкмоль/л) и прооксидантном/цитотоксическом/иммуносупрессивном действии при более высоких концентрациях [11, 13]. В то же время для профилактики рака эффективны концентрации ресвератрола в 10–40 мкмоль/л [19]. Ресвератрол может запускать апоптоз, аутофагию, репликативное старение, митотическую катастрофу опухолевых клеток [20–22].

Гибель клеток, индуцированная повышением внутриклеточной концентрации АФК, рассматривается как предельный случай редокс-регуляции активности клеток, использующейся в качестве одного из подходов противоопухолевой терапии [23]. Ресвератрол относят к перспективным соединениям для редокс-направленной терапии рака за счет индукции образования АФК (супероксидного анион-радикала и пероксида водорода) с участием ферментов дыхательной цепи митохондрий [23]. Учитывая эти обстоятельства, а также тот факт, что лимфоциты относятся к клеткам с остаточной теломеразной активностью, которая может быть активирована путем прямого взаимодействия с голоферментом теломеразы или сигнальными путями, активирующими ее, необходимо исследовать процессы клеточной гибели лимфоцитарных клеток в присутствии ресвератрола в различных концентрациях во взаимосвязи с их антиоксидантным статусом.

Обнаружено [24], что ресвератрол может нарушать структуру ДНК в лимфоцитах при концентрациях 100–200 мкмоль/л. В то же время установлено [5], что *транс*-ресвератрол в концентрациях от 0 до 219 мкмоль/л уменьшал радиационно-индукционное повреждение хромосом лимфоцитов. Наиболее выраженный эффект снижения уровня повреждений ДНК лимфоцитов человека *in vitro* наблюдали при уровне ресвератрола 0.5 мкмоль/л при воздействии радиации в дозах 0.5 и 1 Гр [25]. Ресвератрол значительно ин-

гибирал радиационно-индукционное повреждение ДНК лимфоцитов периферической крови мышей [8]. Он проявляет эффекты гормезиса [5], относится к группе радиомитигаторов за счет антиоксидантных свойств и активации сиртуинов [26, 27]. Однако молекулярные механизмы радиозащитной активности ресвератрола детально не исследованы [15]. Необходимо уточнить диапазоны концентраций полифенола, при которых он проявляет радиопротекторное действие.

В этой связи нами были исследованы некоторые показатели (индикаторы) процессов апоптотической и некротической гибели, а также антиоксидантного статуса лимфоцитов человека, модифицированных воздействием УФ-света (254 нм, 1510 Дж/м²) и пероксида водорода (10^{-5} моль/л) в присутствии ресвератрола в невысоких концентрациях (10^{-7} , 10^{-6} и 10^{-5} моль/л).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объект исследования – 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 Воронежской областной станции переливания крови.

Лимфоциты получали путем центрифugирования гепаринизированной донорской крови в градиенте плотности фикколл-урографина (фи-колл 400 (Diam, Швейцария) – 7.64 г, урографин 76% (Bayer Schering Pharma AG, Германия) – 20 мл, вода – 92.56 мл; $\rho = 1.077 \text{ г/см}^3$) [28]. В центрифужную пробирку на 1 мл градиентной смеси насылали 3 мл гепаринизированной крови, разбавленной раствором Хенкса (0.1 моль/л, pH 7.4 при 20°C) в соотношении 1 : 1. Центрифугирование проводили в течение 15 мин при 200 g. Полученные лимфоциты отбирали пастеровской пипеткой, а затем центрифугировали в избытке раствора Хенкса в течение 10 мин при 180 g. Отмытые лимфоциты суспендировали в растворе Хенкса до рабочей концентрации $2 \cdot 10^6$ кл/мл при помощи камеры Горяева.

Для проверки чистоты полученной суспензии лимфоцитов делали мазки, которые затем окрашивали по методу Романовского–Гимзы [28]. В полученной суспензии лимфоциты составляли 95–97 % всех клеток, 3–5 % приходилось на долю нейтрофилов и моноцитов.

Число жизнеспособных клеток во взвесях определяли методом эксклюзии трипанового синего [28]. Нами установлено, что ресвератрол в

конечной концентрации 10^{-7} , 10^{-6} и 10^{-5} моль/л не влиял на жизнеспособность лимфоцитов.

В работе использовали *транс*-ресвератрол (Shaanxi Hongao Bio-Tech Inc., Китай). Суспензию лимфоцитов с ресвератролом в конечной концентрации 10^{-7} , 10^{-6} и 10^{-5} моль/л инкубировали в течение 1 ч.

УФ-облучение лимфоцитов ($2 \cdot 10^6$ кл/мл), сuspendedированных в растворе Хенкса, проводили в чаше Петри, помещаемой в облучатель BIO-link-BLX 254 нм (Vilber Lourmaet, Франция). Доза облучения лимфоцитов составляла $1510 \text{ Дж}/\text{м}^2$.

При исследовании спектральных характеристик растворов ресвератрола нами выявлены две полосы поглощения: при 214 нм и 298–322 нм ($\lambda_{\max} = 304$ нм), что согласуется с известными данными [29].

Лимфоциты модифицировали пероксидом водорода в конечной концентрации 10^{-5} моль/л. Растворы пероксида водорода готовили с использованием коэффициента молярного поглощения $\text{H}_2\text{O}_2 43.6 \text{ л}\cdot\text{моль}^{-1}\cdot\text{см}^{-1}$ при длине волны 240 нм.

Суспензии нативных и модифицированных воздействием УФ-света и пероксида водорода лимфоцитов в отсутствие и в присутствии ресвератрола инкубировали в течение 1 ч при 37°C в атмосфере 5% CO_2 .

Уровень повреждений ДНК лимфоцитов исследовали методом ДНК-комет, основанным на оценке электрофоретической подвижности ДНК единичных клеток, иммобилизованных в агарозном геле. Регистрируемым изменением является способность ДНК индивидуальной клетки мигрировать в постоянном электрическом поле благодаря нарастающей в процессе гибели деградации генома. Клетки фиксировали в слое легко-плавкой агарозы (Fermentas, США, упругость 1%-го геля – $555 \text{ г}/\text{см}^2$, температура плавления – 64.8°C , температура гелеобразования – 27°C) на поверхности стекла. Пробы готовили, нагревая 150 мг агарозы в 30 мл фосфатно-солевого буфера до полного растворения агарозы. После этого пробы остужали до 37°C и вносили в агарозу интактные и модифицированные клетки. Получившиеся стекла погружали в лизирующий раствор ($2.5 \text{ моль}/\text{l NaCl}$, $100 \text{ ммоль}/\text{l ЭДТА}$, $10 \text{ ммоль}/\text{l трикс-НCl}$, pH 10.0, 0.5% Тритона X-100, 1% додецилсульфата натрия, 10% диметилсульфоксида) и инкубировали 18 ч при 8°C . Затем пробы инкубировали 30 мин в буфере для электрофореза ($300 \text{ ммоль}/\text{l NaOH}$, $1 \text{ ммоль}/\text{l ЭДТА}$, pH 13.0). Электрофорез проводили при напряжении 0.8 В/см в течение 20 мин. После окончания электрофореза стекла промывали в $0.4 \text{ моль}/\text{l}$ трикс-НCl-буфере, pH 7.5. Затем гель окрашивали раствором бромистого этидия, накрывали покров-

ным стеклом и исследовали с помощью флуоресцентного микроскопа (Zeiss 450–490, Ft 510, LP 520, увеличение $400\times$). Изображения ДНК-комет регистрировали цифровым фотоаппаратом. Полученные результаты обрабатывали с помощью специального программного обеспечения для расчета стандартных параметров комет Comet-Score. Рассчитывали процентное содержание ДНК в «хвосте» кометы ($\%T$), характеризующее уровень повреждений в ДНК исследуемых клеток, наличие которых можно рассматривать как сигнал к инициации апоптоза [30].

При исследовании процессов некротической гибели к клеточным суспензиям добавляли по 5 мкл раствора пропидия йодида в растворе Хенкса (соотношение по объему 1 : 3) и инкубировали в темноте в течение 30 мин. Затем в образцы добавляли по 500 мкл раствора Хенкса и осаждали клетки центрифугированием при 1000 об/мин в течение 10 мин на центрифуге MiniSpin. Суспензию лимфоцитов объемом 50 мкл наносили на предметные стекла и высушивали в темноте. Анализ клеток проводили на флуоресцентном микроскопе (Zeiss 450–490, Ft 510, LP 520, увеличение $400\times$).

Уровень АФК в интактных и модифицированных лимфоцитах исследовали флуоресцентным методом при помощи 2',7'-дихлорфлуоресцеиндиацетата на спектрофлуорометре RF-1501 (Shimadzu, Япония) [31].

Уровень каталитической активности каталазы определяли спектрофотометрическим методом при $\lambda = 410$ нм, основанным на оценке светопоглощения цветного комплекса пероксида водорода и водного раствора молибденовокислого аммония.

Ферментативную активность глутатионредуктазы оценивали по скорости окисления НАДФН, регистрируемой спектрофотометрически при длине волны 340 нм.

Концентрацию свободного цитоплазматического кальция в лимфоцитах измеряли с использованием флуоресцентного зонда Fura-2AM на спектрофлуорометре RF-1501 (Shimadzu, Япония) [32].

Уровень пероксидной резистентности лимфоцитов исследовали на биохемилюминометре БХЛ-06М. Для этого в кювету для хемилюминометра вносили 1 мл суспензии лимфоцитов, предварительно проинкубированной с FeSO_4 (10^{-7} моль/л) в течение 10 мин. Затем вносили 0.01 мл пероксида водорода (0.01%) и, переводя кювету в измерительное положение, фиксировали величину интенсивности и светосуммы люминесценции в изучаемой системе.

ДНК из нативных и модифицированных лимфоцитов выделяли с помощью набора «ПРОБА-

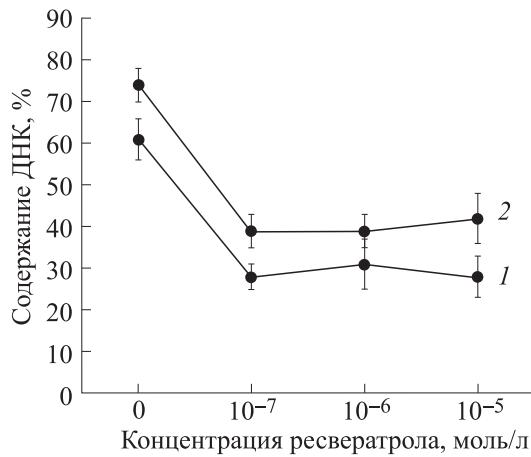


Рис. 1. Изменения процентного содержания ДНК в «хвосте» комет лимфоцитов после воздействия пероксида водорода и УФ-света в присутствии ресвератрола: по оси абсцисс — конечная концентрация ресвератрола, по оси ординат — процентное содержание ДНК в «хвосте» комет; 1 — после воздействия пероксида водорода, 2 — после УФ-облучения.

ГС» («ДНК-технология», Россия). Концентрацию и чистоту ДНК оценивали спектрофотометрическим методом соответственно по оптической плотности препаратов при 260 и 320 нм и соотношению A_{260}/A_{280} . Концентрация ДНК составляла 10 нг/мкл. Целостность выделенной ДНК проверяли с помощью гель-электрофореза в 1% агарозном геле. Спектры флуоресценции системы «ДНК-этидия бромид» регистрировали на спектрофлуорометре RF-1501 (Shimadzu, Япония). Длина волны возбуждения и испускания флуоресценции — 495 и 605 нм соответственно. Конечная концентрация этидия бромида — 0.3 мкмоль/л.

Обработку результатов проводили с помощью пакета статистических программ Statgraphics: определяли среднее значение, стандартное отклонение, доверительный интервал. Достоверность отличий контрольных и экспериментальных результатов оценивали при помощи *t*-критерия Стьюдента. Различия тестируемых показателей считались достоверными при $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Методом ДНК-комет исследован один из маркерных показателей апоптоза — уровень повреждений ДНК лимфоцитов после воздействия пероксида водорода (10^{-5} моль/л) и УФ-света ($1510 \text{ Дж}/\text{м}^2$) в присутствии ресвератрола в конечной концентрации 10^{-7} , 10^{-6} и 10^{-5} моль/л (рис. 1).

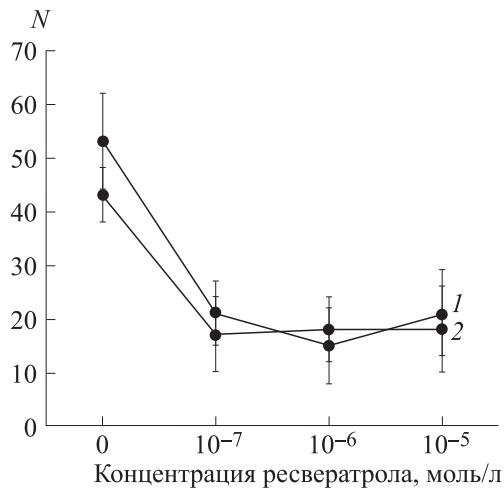


Рис. 2. Количество некротических лимфоцитов (N) через 1 ч после воздействия пероксида водорода и УФ-света в присутствии ресвератрола: по оси абсцисс — конечная концентрация ресвератрола, по оси ординат — количество некротических лимфоцитов в поле зрения; 1 — после воздействия пероксида водорода, 2 — после УФ-облучения.

Через 1 ч после воздействия пероксида водорода и УФ-излучения на лимфоциты уровень повреждений ДНК существенно повышается по сравнению с таковым для интактных клеток ($12 \pm 5\%$). Из анализа данных рис. 1 следует, что в присутствии ресвератрола в использованных концентрациях величина исследуемого параметра статистически достоверно снижается по отношению к таковой для лимфоцитов, модифицированных пероксидом водорода и УФ-светом в отсутствие полифенола.

Методом флуоресцентной микроскопии с окрашиванием ядер иммуноцитов раствором пропидия йодида было определено количество некротических клеток в поле зрения через 1 ч после воздействия пероксида водорода и УФ-света на лимфоциты в отсутствие и в присутствии ресвератрола (рис. 2).

Из этого рисунка следует, что ресвератрол в использованных концентрациях уменьшает количество некротических клеток в суспензии лимфоцитов через 1 ч после воздействия пероксида водорода и УФ-света на клетки по сравнению с таковым для модифицированных свободных иммуноцитов.

Следовательно, ресвератрол в использованных концентрациях снижает уровень повреждений ДНК апоптотических (инициированных к апоптозу) лимфоцитов и количество некротических клеток в условиях воздействия пероксида водорода и УФ-света.

С целью выявления возможных механизмов протекторного эффекта ресвератрола в отноше-

Таблица 1. Изменения уровня внутриклеточных активных форм кислорода, функциональной активности каталазы и глутатионредуктазы лимфоцитов человека, модифицированных воздействием УФ-излучения и пероксида водорода в отсутствие и в присутствии ресвератрола

Показатель	Конечная концентрация ресвератрола, моль/л			
	0	10^{-7}	10^{-6}	10^{-5}
Уровень продукции АФК в интактных клетках, отн. ед.	14.9 ± 2.2	$5.1 \pm 0.9^*$	$9.2 \pm 1.0^*$	$9.7 \pm 0.5^*$
Уровень продукции АФК в $H_2O_2^-$ -модифицированных клетках, отн. ед.	12.5 ± 0.9	$3.6 \pm 0.7^*$	$6.2 \pm 0.5^*$	$4.7 \pm 0.6^*$
Уровень продукции АФК в УФ-облученных клетках, отн. ед.	13.0 ± 1.2	$2.8 \pm 0.5^*$	$4.8 \pm 1.4^*$	$6.0 \pm 1.5^*$
Уровень активности каталазы в интактных клетках, мкмоль/мин	28.0 ± 11.0	$62.0 \pm 9.0^*$	$59.0 \pm 9.0^*$	$60.0 \pm 11.0^*$
Уровень активности каталазы в H_2O_2 -модифицированных клетках, мкмоль/мин	10.0 ± 5.0	$77.0 \pm 5.0^*$	$62.0 \pm 14.0^*$	$76.0 \pm 3.0^*$
Уровень активности каталазы в УФ-облученных клетках, мкмоль/мин	23.0 ± 6.0	$93.0 \pm 3.0^*$	$92.0 \pm 4.0^*$	$104 \pm 15^*$
Уровень активности глутатионредуктазы в интактных клетках, мкмоль/мин	7.3 ± 1.2	9.4 ± 0.9	7.7 ± 0.6	7.9 ± 0.8
Уровень активности глутатионредуктазы в H_2O_2 -модифицированных клетках, мкмоль/мин	9.2 ± 0.6	$16.3 \pm 0.9^*$	$16.9 \pm 1.2^*$	$15.4 \pm 2.0^*$
Уровень активности глутатионредуктазы в УФ-облученных клетках, мкмоль/мин	2.0 ± 0.5	$5.4 \pm 0.8^*$	$6.0 \pm 0.6^*$	$6.0 \pm 0.5^*$

Примечание. * – Отличия от контроля (без ресвератрола) статистически достоверны.

нии иммуноцитов были исследованы изменения уровня продукции АФК, функциональной активности каталазы и глутатионредуктазы лимфоцитов, модифицированных воздействием УФ-света и пероксида водорода в отсутствие и в присутствии ресвератрола (табл. 1).

Обнаружено (табл. 1), что воздействие ресвератрола в конечной концентрации 10^{-7} , 10^{-6} и 10^{-5} моль/л в течение 1 ч на суспензию интактных лимфоцитов индуцирует статистически значимое снижение уровня внутриклеточных активных форм кислорода по сравнению с таковым для нативных (немодифицированных) иммуноцитов. Уровень АФК – один из индикаторов митохондриального механизма апоптоза – в лимфоцитах, подвергнутых воздействию УФ-излучения и пероксида водорода в присутствии ресвератрола в тех же концентрациях, статистически достоверно снижается по отношению к величинам исследуемого параметра для клеток, модифицированных в отсутствие полифенола.

Уровень функциональной активности каталазы интактных лимфоцитов после воздействия ресвератрола в использованных концентрациях 10^{-7} , 10^{-6} и 10^{-5} моль/л увеличивается соответ-

ственно в 2.2, 2.1 и 2.1 раза по сравнению с таким для клеток в отсутствие полифенола (табл. 1). Величины активности каталазы лимфоцитов после воздействия пероксида водорода и УФ-света в присутствии ресвератрола в тех же концентрациях статистически достоверно увеличиваются соответственно в 7.7, 6.2, 7.6 и 4.0, 4.0, 4.5 раза по сравнению с таковыми для модифицированных клеток в отсутствие полифенола (табл. 1).

Воздействие ресвератрола на интактные лимфоциты не изменяет уровень активности глутатионредуктазы (табл. 1). Уровень активности глутатионредуктазы лимфоцитов после воздействия H_2O_2 и УФ-излучения в присутствии ресвератрола в тех же концентрациях увеличивается соответственно в 1.8, 1.8, 1.7 и 2.7, 3.0, 3.0 раза по сравнению с таковым для модифицированных клеток в отсутствие биогенного агента (табл. 1).

При этом общий уровень белка в исследуемых модифицированных клетках не изменяется по отношению к таковому для интактных лимфоцитов.

Повышение величин активности каталазы в интактных и модифицированных лимфоцитах в присутствии ресвератрола приводит, по всей ве-

Таблица 2. Изменения люминесцентных характеристик лимфоцитов в присутствии ресвератрола

Показатель	Конечная концентрация ресвератрола, моль/л			
	0	10^{-7}	10^{-6}	10^{-5}
Величина светосуммы люминесценции (S), мВ·сек	314 ± 23	$132 \pm 17^*$	$164 \pm 24^*$	$153 \pm 20^*$
Интенсивность люминесценции (I_{max}), отн. ед.	73 ± 8	$7 \pm 4^*$	$3 \pm 2^*$	$5 \pm 2^*$

Примечание. * – Отличия от контроля (без ресвератрола) статистически достоверны.

Таблица 3. Изменения уровня внутриклеточного кальция (нмоль/л) в лимфоцитах, модифицированных воздействием пероксида водорода и УФ-света в присутствии ресвератрола

Образец	Конечная концентрация ресвератрола, моль/л			
	0	10^{-7}	10^{-6}	10^{-5}
Интактные лимфоциты	95 ± 7	$31 \pm 4^*$	$60 \pm 8^*$	$46 \pm 8^*$
Лимфоциты, модифицированные пероксидом водорода	164 ± 18	$48 \pm 15^*$	$76 \pm 14^*$	$61 \pm 9^*$

Примечание. * – Отличия от контроля (без ресвератрола) статистически достоверны.

роятности, к снижению уровня пероксида водорода и других внутриклеточных активных форм кислорода. Активация глутатионредуктазы в иммunoцитах после воздействия пероксида водорода и УФ-облучения клеток в присутствии полифенола индуцирует процессы восстановления окисленного глутатиона – низкомолекулярного антиоксиданта, дезактивирующего активные формы кислорода и участвующего в процессах функционирования глутатионзависимых ферментов.

При исследовании пероксидной резистентности мембран нативных лимфоцитов в присутствии ресвератрола выявлено снижение интенсивности свободно-радикальных процессов на поверхности иммunoцитов по сравнению с таковой для клеток без ресвератрола (табл. 2).

Обнаружено снижение уровня внутриклеточного кальция – медиатора апоптоза и «участника» процессов некроза – в цитозоле интактных и

модифицированных воздействием пероксида водорода и УФ-света лимфоцитах в присутствии ресвератрола (табл. 3). Это может быть связано с перераспределением свободных ионов кальция между клеточными компартментами, в частности, депонированием в эндоплазматическом ретикулуме и выкачиванием из клетки в среду.

В модельном эксперименте при исследовании флуоресценции в системе «ДНК лимфоцитов–этидия бромид» в присутствии ресвератрола (10^{-7} , 10^{-5} моль/л) наблюдали снижение интенсивности флуоресценции в максимуме (табл. 4), что указывает на возможность взаимодействия (интеркаляции) полифенола с молекулами ДНК. Аналогичные изменения интенсивности флуоресценции исследуемой системы обнаружены после добавления ресвератрола к ДНК, модифицированной воздействием пероксида водорода и УФ-света.

Таблица 4. Изменения интенсивности флуоресценции системы ДНК-этидия бромид в максимуме в интактном состоянии и после воздействия пероксида водорода и УФ-света на ДНК в присутствии ресвератрола

Образец	Конечная концентрация ресвератрола, моль/л		
	0	10^{-7}	10^{-5}
Интактная ДНК	628 ± 19	$554 \pm 15^*$	$519 \pm 18^*$
ДНК после воздействия пероксида водорода	605 ± 10	$504 \pm 12^*$	$463 \pm 15^*$
ДНК после УФ-облучения	614 ± 20	$555 \pm 16^*$	$485 \pm 10^*$

Примечание. Значения интенсивности флуоресценции приведены в отн. ед. * – Отличия от контроля (без ресвератрола) статистически достоверны.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Нами установлено, что ресвератрол за счет снижения уровня продукции внутриклеточных активных форм кислорода и ионов кальция, повышения активности антиоксидантных ферментов – каталазы и глутатионредуктазы, увеличения пероксидной резистентности плазматических мембран, может выступать в качестве регулятора процессов апоптоза и некроза лимфоцитов, индуцированных экзогенным пероксидом водорода (10^{-5} моль/л) и УФ-облучением (254 нм, 1510 Дж/м²). Вероятно, ресвератрол способен взаимодействовать с молекулами ДНК и повышать ее устойчивость к действию модифицирующих агентов.

В наших экспериментах не выявлена зависимость обнаруженных эффектов ресвератрола от его концентрации, поэтому эти данные трудно формализовать. Полифенол в конечных концентрациях 10^{-7} , 10^{-6} и 10^{-5} моль/л проявлял практически одинаковый уровень активности. По-видимому, отсутствие усиления цитопротективных и антиоксидантных эффектов ресвератрола при повышении его уровня связано с его бифункциональным действием.

Полагают [13], что ресвератрол действует через ядерный фактор NF-кВ, контролирующий экспрессию генов иммунного ответа, апоптоза, клеточного цикла. Ресвератрол увеличивает уровень транскрипционного фактора NF-кВ, 5'-аденоzinмонофосфат-активируемой протеинкиназы – сиртуина (SIRT1), гамма-коактиватора рецептора активатора пролиферации пероксисом (PGG-1α), антиоксидантных ферментов. Антиоксидантное действие реализуется за счет белка SIRT1 (NAD-зависимой деацетилазы), подавляющего апоптоз [13], увеличения концентрации антиоксидантных ферментов (глутатионпероксидазы, глутатионредуктазы, глутатионтрансферазы, каталазы, супероксиддисмутазы) и глутатиона, снижения продукции АФК, ингибирования пероксидного окисления липидов [33–35]. Ресвератрол может непосредственно выступать в качестве антиоксиданта в концентрации 10^{-6} моль/л и ингибировать пероксид водорода в модельных экспериментах [36], что обусловлено наличием в его молекуле двух фенольных колец с тремя гидроксильными группами [13]. Ресвератрол регулирует апоптоз через SIRT1, транскрипционные факторы (Foxo1 и p53), проапоптотические белки семейства Bcl-2 (Bim и Bax), антиапоптотический белок семейства Bcl-2 (Bcl) [34]. Антиапоптотический эффект полифенола может проявляться за счет повышения уровня супероксиддисмутазы, снижения уровня АФК [7].

Влияние ресвератрола на процессы кальций-зависимых путей реализации апоптоза и некроза

может быть обусловлено его способностью модулировать внутриклеточную передачу сигналов кальция. Так, влияние ресвератрола на иммунные клетки связывают с модификацией цитозольной концентрации кальция посредством блокирования его входа в клетку и депонирования [37]. Однако конкретные механизмы изменений кальциевой сигнальной трансдукции клеток в присутствии ресвератрола не установлены.

Модуляция процессов реализации p53-зависимого пути ядерного механизма апоптоза может быть связана с взаимодействием ресвератрола с ДНК, что проявлялось в модельных экспериментах как снижение уровня флуоресценции в системе ДНК-этидия бромид в интактном состоянии и после модификации ДНК пероксидом водорода и УФ-облучением. Ресвератрол относят к ДНК-тропным соединениям, способность которых к интеркаляции в ДНК демонстрируют по тушению флуоресценции красителей (этидия бромида, акридинового оранжевого) [18, 38]. В клетках ресвератрол способен опосредованно влиять на репарацию ДНК и поддержание структуры хроматина [39]. По-видимому, при взаимодействии ресвератрола с ДНК происходит частичное раскручивание двойной спирали и изменение конформации ДНК, что нарушает образование водородных связей и интенсивность электростатических взаимодействий между фосфатными группами.

Обобщая результаты наших исследований, можно заключить, что ресвератрол в условиях воздействия пероксида водорода и УФ-излучения на лимфоциты может регулировать процессы митохондриального механизма апоптоза, связанные с увеличением внутриклеточного уровня АФК, отдельные этапы ядерного механизма, инициирующиеся вследствие повреждения молекул ДНК, а также, по-видимому, процессы «кальций-зависимых» путей программированной клеточной смерти.

В то же время не исключено, что защитное (митигаторное) действие ресвератрола может быть обусловлено его взаимодействием с лимфоцитарными мембранными, влиянием на состояние рецепторов смерти Fas, опосредующих рецепторный механизм апоптоза. Показано [40], что ресвератрол накапливается в липидных рафтах, поглощается клетками посредством рецепторзависимого эндоцитоза, в результате чего активируются киназные пути сигнальной трансдукции, перераспределяются рецепторы клеточной смерти внутри липидных микродоменов (рафтов) мембран и запускается апоптоз опухолевых клеток. Липидные рафты ассоциированы с организующими центрами (платформами) сборки и активации апоптотических и сигнальных молекул, участвующих в клеточной гибели [41].

Повышение уровня пероксидной резистентности лимфоцитов, модифицированных воздействием пероксида водорода и УФ-света в присутствии ресвератрола, а также снижение количества некротических клеток могут быть связаны со стабилизацией мембран иммуноцитов, индуцированной взаимодействием полифенола с липидным бислоем. Установлено [42], что встраивание ресвератрола в липидные мембранные сопровождается повышением их текучести и проницаемости. Представления о локализации ресвератрола в липидных бислоях противоречивы и требуют детализации и уточнения. Показано [42], что ресвератрол может накапливаться в области гидрофильных головок мембранных липидов и образовывать водородные связи между гидроксильными группами молекул полифенола и гидрофильными группами липидов. Полагают [41], что ресвератрол, взаимодействуя с гидрофобными хвостами фосфолипидов, локализуется в неполярной зоне мембранны (в области рафтов), защищая ее от пероксидного окисления липидов.

ВЫВОДЫ

Обнаружено снижение уровня повреждений ДНК – маркерного показателя апоптоза – и количества некротических лимфоцитов периферической крови человека после воздействия УФ-света (254 нм, 1510 Дж/м²) и пероксида водорода (10^{-5} моль/л) в присутствии ресвератрола (10^{-7} , 10^{-6} и 10^{-5} моль/л). Уменьшение интенсивности процессов клеточной гибели иммуноцитов в присутствии ресвератрола обусловлено снижением уровня продукции внутриклеточных активных форм кислорода и ионов кальция, повышением активности антиоксидантных ферментов – катализы и глутатионредуктазы, увеличением пероксидной резистентности плазматических мембран, взаимодействием полифенола с ДНК.

Полученные нами данные расширяют современные представления об цитопротективном, антиапоптотическом и антиоксидантном действии ресвератрола в концентрациях 10^{-7} , 10^{-6} и 10^{-5} моль/л на лимфоциты крови человека в условиях воздействия пероксида водорода и УФ-света. Они полезны при обсуждении вопросов, касающихся разработки способов регулирования процессов клеточной гибели иммуноцитов, а также выявления механизмов фото-, радио- и геропротекторного действия ресвератрола.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при поддержке Министерства науки и высшего образования РФ в рамках Государственного задания ВУЗам в сфере науч-

ной деятельности на 2023–2025 годы, проект № FZGU-2023-0009.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов, связанных с изложенными в статье данными.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит описания собственных исследований с участием людей или животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Nakvasina M. A., Holyavka M. G., Artyukhov V. G., Radchenko M. S., and Lidokhova O. V. Mechanisms of UV-induced human lymphocytes apoptosis. *Biophys. Rev.*, **15** (5), 1257–1267 (2023). DOI: 10.1007/s12551-023-01142-w
- Наквасина М. А., Артюхов В. Г. и Свекло Л. С. Механизмы гибели лимфоцитов человека, индуцированной УФ-излучением и активными формами кислорода. *Вестн. ВГУ. Серия: Химия. Биология. Фармация*, **1**, 61–74 (2023).
- Kalantari H. and Das D. K. Physiological effects of resveratrol. *BioFactors*, **36** (5), 401–406 (2010). DOI: 10.1002/biof.100
- Yu W., Fu Y.-C., and Wang W. Cellular and molecular effects of resveratrol in health and disease. *J. Cell. Biochem.*, **113** (3), 752–759 (2012). DOI: 10.1002/jcb.23431
- Sebastia N., Almonacid M., Villaescusa J. I., Cervera J., Such E., Silla M. A., Soriano J. M., and Montoro A. Radioprotective activity and cytogenetic effect of resveratrol in human lymphocytes: An *in vitro* evaluation. *Food Chem. Toxicol.*, **51**, 391–395 (2013). DOI: 10.1016/j.fct.2012.10.013
- Park E.-J., Pezzuto J.M. The pharmacology of resveratrol in animals and humans. *Biochim. Biophys. Acta*, **1852** (6), 1071–1113 (2015). DOI: 10.1016/bbadis.2015.01.014
- Singh A., Sati S., and Mishra R. I. Resveratrol: antioxidant-pro-oxidant. *Int. J. Tech. Res. Sci.*, **1** (6), 106–112 (2016).
- Koohian F., Shafei A., Shahbazi-Gahrouei D., and Moradi M.-T. The radioprotective effect of resveratrol against genotoxicity induced by γ -irradiation in mice blood lymphocytes. *Dose-Response*, **15** (2), 1559325817705699 (2017). DOI: 10.11177/1559325817705699
- Ivanova D., Zhelev Z., Semkova S., Aoki I., and Bakalova R. Resveratrol modulates the redox-status and cytotoxicity of anticancer drugs by sensitizing leukemic lymphocytes and protecting normal lymphocytes. *Anticancer Res.*, **39** (7), 3745–3755 (2019). DOI: 10.21873/anti-canres.13523

10. Malaguarnera L. Influence of resveratrol on the immune response. *Nutrients*, **11** (5), 946 (2019). DOI: 10.3390/nu11050946
11. Shaito A., Posadino A. M., Younes N., Nasan H., Halabi S., Alhababi D., Al-Mohannadi A., Abdel-Rahman V., Eid A. H., Nasrallah G. K., and Pintus G. Potential adverse effects of resveratrol: a literature review. *Int. J. Sci.*, **21** (6), 2084 (2020). DOI: 10.3390/ijms21062084.
12. Agbele A. T., Fasoro O. J., Fabamise O. M., Oluyide O. O., Idolor O. R., and Bamise E. A. Normal tissue damage by resveratrol: a systematic review. *Euras. J. Med.*, **52** (3), 298–303 (2020). DOI: 10.5152/eurasianjmed.2020.20143
13. Пальцын А. А. Ресвератрол. *Патологич. физиология и эксперим. терапия*, **65** (1), 116–123 (2021). DOI: 10.25557/0031-2991.2021.01.116-123
14. Alesci A., Nicosia N., Fumia A., Giorgianni F., Santini A., and Cicero N. Resveratrol and immune cells: a link to improve human health. *Molecules*, **27** (2), 424 (2022). DOI: 10.3390/molecules27020424
15. Gramatyka M. The radioprotective activity of resveratrol – metabolomics point of view. *Metabolites*, **12** (6), 478 (2022). DOI: 10.3390/metabo12060478
16. Коваленко Н. А., Жданов Д. Д. и Коваленко Т. Ф. Возможности и эффекты активации теломеразы. *Молекуляр. биология*, **47** (4), 544–557 (2013).
17. Bastianetto S., Ménard C., and Quirion R. Neuroprotective action of resveratrol. *Biochim. Biophys. Acta*, **1852** (6), 1195–1201 (2015). DOI: 10.1016/j.bbadic.2014.09.011
18. Власова О. А., Борунова А. А., Сафина А., Сметанина И. В., Лесовая Е. А., Белицкий Г. А., Заботина Т. Н., Гурова К., Кирсанов К. И. и Якубовская М. Г. Активация сигнального пути интерферона-альфа ресвератролом, генистином и кверцетином. *Сиб. онкол. журн.*, **18** (1), 50–55 (2019). DOI: 10.21294/1814-4861-2019.-18-1-50-55
19. Mukherjee S., Dudley D. I., and Das D. K. Dose-dependency of resveratrol in providing health benefits. *Dose-response*, **8** (4), 478–500 (2010). DOI: 10.2203/dose-response.09-015. Mukherjee
20. Lin H. Y., Tang H. Y., Davis F. B., and Davis P. J. Resveratrol and apoptosis. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **1215**, 79–88 (2011). DOI: 10.1111/j.1749-6632.2010.05846.x
21. Delmas D., Solary E., and Latruffe N. Resveratrol, a phytochemical inducer of multiple cell death pathways: apoptosis, autophagy and mitotic catastrophe. *Curr. Med. Chem.*, **18** (8), 1100–1121 (2011). DOI: 10.2174/092986711795029708
22. Fu X., Li M., Huang Z., and Najafi M. Targeting of cancer cell death mechanisms by resveratrol: a review. *Apoptosis*, **26** (11–12), 561–573 (2021). DOI: 10.1007/s10495-021-01689-7
23. Мартинович Г. Г., Мартинович И. В., Голубева Е. Н., Черенкевич С. Н., Демидчик Ю. Е., Гайн Ю. М., Владимирская Т. Э. и Лущик М. Л. Редокс-биотехнологии как основа для новой стратегии в противовопухолевой терапии. *Весці нац. Акад. навук Беларусі*, **2**, 85–104 (2012).
24. Basso E., Regazzo G., Fiore M., Palma V., Traversi G., Testa A., Degrassi F., and Cozzi R. Resveratrol affects DNA damage induced by ionizing radiation in human lymphocytes in vitro. *Mutat. Res. Genet. Toxicol. Environ. Mutagen*, **806**, 40–46 (2016). DOI: 10.1016/j.mrgentox.2016.07.005
25. Dobrzynska M. M. and Gajowik A. Protection and mitigation by resveratrol of DNA damage induced in irradiated human lymphocytes *in vitro*. *Radiat. Res.*, **197** (2), 149–156 (2022). DOI: 10.1667/RADE-20-00037.1
26. Легеза В. И., Гребенюк А. Н. и Драчёв И. С. Радиомитигаторы: классификация, фармакологические свойства, перспективы применения. *Радиац. биология. Радиоэкология*, **59** (2), 161–169 (2019). DOI: 10.1134/S0869803119020097
27. Быков В. Н., Гребенюк А. Н. и Ушаков И. Б. Перспективы использования противолучевых средств для предотвращения эффектов, связанных со старением организма. *Радиац. биология. Радиоэкология*, **59** (5), 488–502 (2019). DOI: 10.1134/S0869803119050035
28. *Лимфоциты. Методы*. Под ред. Дж. Клауса (Мир, М., 1990).
29. Кречетов С. П., Масленникова М. С., Соловьева Н. Л. и Краснюк И. И. Обоснование оптимального состава композиций ресвератрола с солюбилизаторами. *Рос. биотерапевтич. журн.*, **20** (3), 57–65 (2021).
30. Hartmann A., Agurell E., Beevers C., Brendler-Schwaab S., Burlinson B., Clay P., Collins A., Smith A., Speit G., Thybaud V., and Tice R.R. Recommendations for conducting the *in vivo* alkaline comet assay. *Mutagenesis*, **18**, 45–51 (2003). DOI: 10.1093/mutage/18.1.45.
31. Rastogi R. P., Singh S. P., Häder D. P., and 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.*, **397** (3), 603–607 (2010). DOI: 10.1016/j.bbrc.2010.06.006.
32. Hirst R. A., Harrison C., Hirota K., and Lambert D. G. Measurement of $[Ca^{2+}]_i$ in whole cell suspensions using fura-2. *Methods Mol. Biol.*, **312**, 37–45 (2005). DOI: 10.1385/1-59259-949-4:037.
33. Galiniak S., Aebisher D., and Bartusik-Aebisher D. Health benefits of resveratrol administration. *Acta Biochim. Pol.*, **66** (1), 13–21 (2019). DOI: 10.18388/abp.2018_2749
34. Zhou D.-D., Luo M., Huang S.-Y., Saimaiti A., Shang A., Gan R.-Y., and Li H.-B. Effects and mechanisms of resveratrol on aging and age-related diseases. *Oxidative Med. Cell. Longevity*, **4**, 1 (2021). DOI: 10.1155/2021/9932218.
35. Пиняев С. И., Мельникова Н. А., Морозова А. А., Ревина Н. В., Спирина Ю. П., Дулепова Е. А. и Ревин В. В. Влияние ресвератрола на конформационное состояние жирных кислот и уровень перекисного окисления липидов в поврежденных соматических

- ских нервах. *Вестн. ВГУ. Серия: Химия. Биология. Фармация*, **2**, 78–85 (2016).
36. Наквасина М. А., Артюхов В. Г., Старикова Т. И. и Сараджи Н. Г. Пути реализации апоптоза лимфоцитов человека, индуцированного пероксидом водорода, и их регулирование. *Актуальные вопросы биологической физики и химии*, **7** (3), 440–445 (2022).
 37. McCalley A. E., Kaja S., Payne A. J., and Koulen P. Resveratrol and calcium signaling: molecular mechanisms and clinical relevance. *Molecules*, **19** (6), 7327–7340 (2014). DOI: 10.3390/molecules19067327
 38. Zang S., Sun X., Jing Z., and Qu F. Spectroscopic analysis on the resveratrol-DNA binding interactions at physiological pH. *Spectrochim. Acta, Part A*, **82** (1), 213–216 (2011). DOI: 10.1016/j.saa.2011.07.037
 39. Leone S., Cornetta T., Basso E., and Cozzi R.. Resveratrol induces DNA double-strand breaks through human topoisomerase II interaction. *Cancer letters*, **295** (2), 167–172 (2010). DOI: 10.1016/j.canlet.2010.02.022
 40. Delmas D., Aires V., Colin D. J., Limagne E., Scagliarini A., Cotte A. K., and Ghiringhelli F. Importance of lipid microdomains, rafts, in absorption, delivery, and biological effects of resveratrol. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **1290** (1), 90–97 (2013). DOI: 10.1111/nyas.1277
 41. Neves A. R., Nunes C., and Reis S. Resveratrol induces ordered domains formation in biomembranes: Implication for its pleiotropic action. *Biochim. Biophys. Acta*, **1858** (1), 12–18 (2016). DOI: 10.1016/j.bbamem.2015.10.005
 42. Plachta L., Mach M., Kowalska M., and Wydro P. The effect of trans-resveratrol on the physicochemical properties of lipid membranes with different cholesterol content. *Biochim. Biophys. Acta*, **1866** (1), 184 (2024). DOI: 10.1016/j.bbamem.2023.184212

Cytoprotective and Antioxidant Effect of Resveratrol on Human Lymphocytes Modified with Hydrogen Peroxide and UV Light

М.А. Nakvasina*, В.Г. Artyukhov*, Е.Н. Chursanova*, **, О.В. Myachina, Е.І. Korpusova*, А.Ю. Deenkova*, and В.А. Shestykh***

*Voronezh State University, Universitetskaya pl. 1, Voronezh, 394018 Russia

**N.N. Burdenko Voronezh State Medical University, Ministry of Healthcare of the Russian Federation, Studencheskaya ul. 10, Voronezh, 394036 Russia

A decrease in the intensity of the processes of apoptotic and necrotic death of human peripheral blood lymphocytes was found after exposure to UV light (254 nm, 1510 J/m²) and hydrogen peroxide (10⁻⁵ mol/l) in the presence of resveratrol (10⁻⁷, 10⁻⁶, 10⁻⁵ mol/l). It was revealed that the cytoprotective effect of resveratrol on lymphocytes is due to a decrease in the level of production of intracellular reactive oxygen species and calcium ions, an increase in the activity of antioxidant enzymes - catalase and glutathione reductase, an increase in peroxide resistance of plasma membranes, and interaction with DNA. Possible mechanisms of action of resveratrol as a regulator of the processes of apoptotic and necrotic death of lymphocytes induced by exposure to hydrogen peroxide and UV radiation are discussed.

Keywords: lymphocytes, resveratrol, hydrogen peroxide, UV light, apoptosis, necrosis