

## **ОСОБЕННОСТИ ИЗМЕНЕНИЙ СВЕРХСПИРАЛЬНОЙ ДНК ЛИМФОЦИТОВ И ИММУНИТЕТА ЧЕЛОВЕКА ПРИ ХРОНИЧЕСКИХ ПЕРЕГРУЗКАХ**

Ващенко В.И., Никитин В.Ю., Вильянинов В.Н., Ващенко Т.Н., Т.Б. Титулова

*Федеральное государственное военное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Военно-медицинская академия имени С.М.Кирова» Министерства обороны Российской Федерации (Военно-медицинская академия имени С.М.Кирова) 194044, г. Санкт-Петербург, ул. Академика Лебедева, дом 6  
тел.(812) 495-72-71, E-mail: [vladimir-vaschenko@yandex.ru](mailto:vladimir-vaschenko@yandex.ru)*

### **Резюме:**

Исследовались изменения конформации сверхспиральной ДНК (ссДНК) лимфоцитов крови и состояние иммунной системы у 24 добровольцев, которым на экспериментальной установке создавались поперечные гравитационные перегрузки (1,5 g × 1 ч) трехкратно с интервалом в 2-е суток в процессе изучения адаптации человека к хроническим перегрузкам. Для выявления внутриклеточных биохимических изменений при хронических перегрузках разработана на основе математических параметров кривых флуоресценции новая методика регистрации изменений топологической структуры (ПСС, ИКН) ссДНК лимфоцитов при помощи проточной лазерной цитофлуориметрии. В ходе экспериментов установлено, что значения показателя ИКН ссДНК лимфоцитов по завершении исследований были в 1,5 раза выше по сравнению с исходным, до проведения испытаний, уровнем. Содержание цитокинов в крови человека на первом этапе испытаний возрастало, а по завершению – снижалось, что свидетельствовало о незавершенности процесса адаптации. О значительных энергозатратах и включении резервных путей метаболизма лимфоидных клеток в процессе адаптации к хроническим перегрузкам свидетельствовал уровень изменений показателей неспецифической резистентности организма (НСТ-тест, ЛКТ-индекс), который зависел от количества этапов производимых испытаний. Величина показателя ПСС ссДНК (-0,058 сверхвитков/10 пар оснований) на всех этапах испытаний не отличалась от контрольного уровня, демонстрируя, таким образом, отсутствие деструктивных изменений генома клеток иммунной системы и преморбидных процессов в организме испытуемых в процессе адаптации к хроническим перегрузкам.

**Ключевые слова:** сверхспиральная ДНК, лазерная цитофлуориметрия, гравитационные перегрузки, адаптация, иммунитет.

**FEATURES OF CHANGES OF THE SUPERHELICAL DNA OF WOLE BLOOD  
CELLS AND IMMUNITY OF THE HUMAN IN CONDITIONS OF CHRONIC  
OVERLOADS**

Vashchenko V.I., Nikitin V.Yu., Vilyaninov V.N., Vashchenko T.N., T.B. Titulova

*Federal state of military educational institutions of higher education "Military Medical  
Academy*

*after S. M. Kirov" Ministry of Defence Russian Federation (Military Medical Academy after  
S. M. Kirov) 194044, Russia, St. Petersburg, Ac. Lebedev Street, 6*

**Summary:**

In this research were investigated changes of conditions by supercoiled DNA (scDNA) white blood cells and the status of immune system of 24 volunteers during experimental installation and modelling of cross-section gravitational overloads ( $1,5 \text{ g} \times 1 \text{ h}$ ) for three times with an interval in 2 days in the course of studying of adaptation of the human to chronic overloads. The new technique of registration of changes of topological structure is developed for revealing of endocellular biochemical changes at chronic overloads ( $\sigma$ , ISI) scDNA white blood cells by means of flowing flow laser cytometry on the basis mathematical parametres of curves of fluorescence. During experiments it is established, that values of indicator ISI scDNA white blood cells on termination of researches were in 1,5 times above in comparison with initial, before carrying out of tests, level. The maintenance cytokines in blood of the person at the first stage of tests increased, and at the finishing stage - decreased, that testified to incompleteness of process of adaptation. Level of changes of indicators of nonspecific resistance of an organism testified to considerable power inputs and inclusion of reserve ways of a metabolism white blood cells cages in the course of adaptation to chronic overloads (the NBT-TEST, the LCT-INDEX) which depended on quantity of stages of made tests. The size of indicator  $\sigma$  scDNA (-0,058) at all stages of tests did not differ from a test objective level, showing thus, absence of destructive changes genetics structure cages of immune system and prepathology processes an organism of verifiers in the course of adaptation to chronic overloads.

**Key words:** supercoiled DNA, flow laser cytometry, gravitational overloads, adaptation, immunity.

**Введение.** В настоящее время значительно возрос интерес к изучению биохимических механизмов ядерно-цитоплазматических изменений в клетках лимфоидной системы при

при адаптации живых существ к воздействию неблагоприятных факторов окружающей среды [1]. Важное место в этих исследованиях занимает проблема структурных изменений ДНК и, в частности, топологии сверхспиральной ДНК (ссДНК). В наших исследованиях установлено [2-6], что существует непосредственная связь между изменением параметров ссДНК и состоянием иммунной системы человека и животных при разных видах экстремальных воздействий. Показано, что глубина структурных нарушений топологических параметров ссДНК зависит от уровня адаптационных возможностей организма. Выяснено также, что по изменению показателей иммунитета и неспецифической резистентности, можно вполне адекватно характеризовать адаптационный потенциал людей в процессе их профессиональной деятельности [7,8].

**Цель исследования.** Изучить особенности изменений топологических параметров ссДНК лимфоцитов и состояния иммунитета при адаптации организма испытуемых к хроническим гравитационным перегрузкам.

**Материал и методы исследования.** В испытаниях участвовали 24 физически здоровые мужчины в возрасте 25-35 лет. Поперечные гравитационные перегрузки (1,5g × 1 ч) создавались на экспериментальной центрифужной установке трехкратно с интервалом 2 суток. Состояние иммунитета у испытуемых оценивали методом проточной цитометрии по содержанию субпопуляций Т-лимфоцитов (CD3, CD4, CD8), определяемых с использованием моноклональных антител «Ortho-Diagnostics»[9] и В-лимфоцитов (В-IgM+, В-IgG+, В-IgA+), регистрируемых при помощи свинных моноспецифических антисывороток, меченых ФИТЦ [10]. Содержание сывороточных иммуноглобулинов IgM, IgG, IgA и фактор С<sub>3</sub> исследовали методом радиальной иммунодиффузии по Манчини, активность митохондриальных ферментов: сукцинат-дегидрогеназы (СДГ) и альфа-глицерофосфатдегидрогеназы (α-ГФДГ) в лимфоцитах - цитохимическим методом по Нарциссову; показатели неспецифической резистентности - по активности аэробных (НСТ-тест) и анаэробных (ЛКТ-тест) систем фагоцитов [11]. Топологические параметры ссДНК: плотность сверхспирализации (ПСС) и индекс конформационной напряженности (ИКН) в лимфоцитах определяли на проточном лазерном цитофлюориметре «FACScan-400» методом Милнера [12] в нашей модификации [2]. Статистическую обработку данных осуществляли на персональном компьютере методами вариационной статистики, используя пакет прикладных программ ОМИС [13].

**Результаты исследования и их обсуждение.** В первой серии экспериментов нами был разработан новый методический прием для регистрации конформационных изменений (ПСС, ИКН) ссДНК в лимфоцитах человека при использовании проточного цитометра. Данные по кривым титрования «нуклеоидов» этидий бромидом,

полученные в процессе этих исследований показывают, что статистические параметры распределения интенсивности флуоресценции «нуклеоидов» лимфоцитов отражают динамику изменений топологических параметров ссДНК (рис.1), которые зависели от содержания этидий бромида в лизирующей смеси (ЛС). В частности, распределение значений параметра

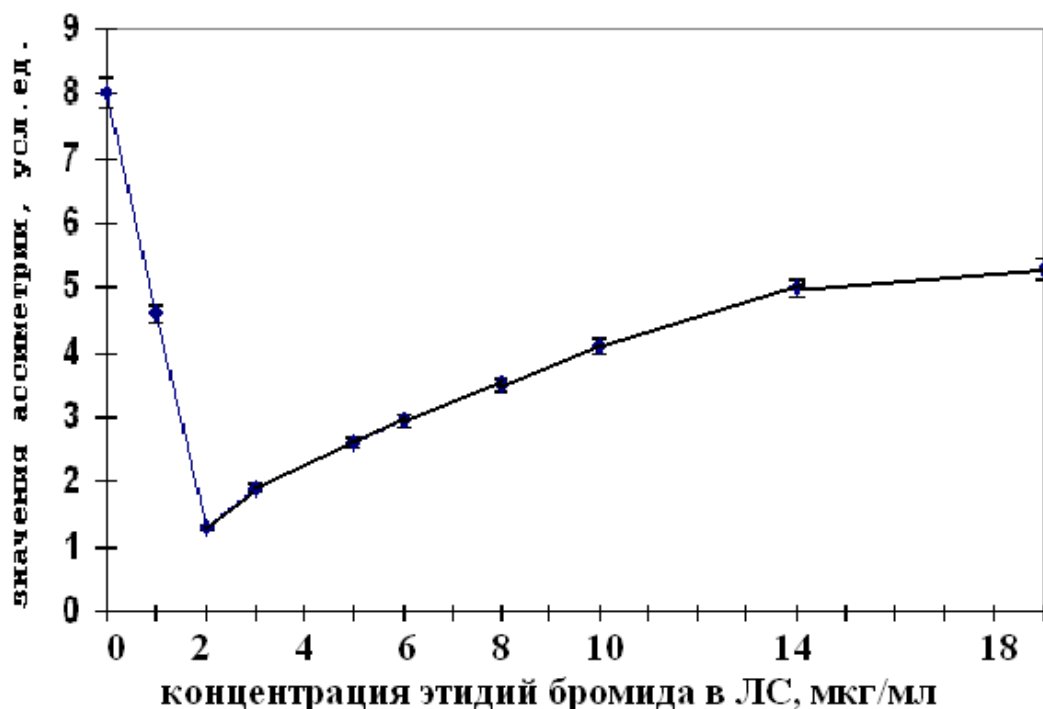


Рисунок 1. Динамика изменений параметров асимметрии кривой титрования этидий бромидом «нуклеоидов» лимфоцитов при лазерной цитофлуориметрии.

асимметрии при изменении концентрации интеркалятора (этидий бромида) в лизирующей смеси (ЛС) имеет форму кривой, сопоставимой с кривой, получаемой классическим методом при ультрацентрифугировании «нуклеоидов» в градиенте плотности сахарозы [14]. Известно, что на кривой седиментации имеется минимум, используемый для расчета плотности сверхспирализации ссДНК, который, как видно из рисунка, соответствует минимуму на кривой асимметрии (рис.1) и, следовательно, значение этого минимума можно использовать для оценки плотности сверхспирализации ссДНК. С другой стороны, изменение значений эксцесса пропорционально увеличению содержания этидий бромида в ЛС, от концентрации которого зависит диаметр “halo” «нуклеоидов» клеток эукариот. “Halo”, как установлено в многочисленных экспериментах, изменяется при различных неблагоприятных воздействиях и характеризует конформационную напряженность ссДНК [15].

Во всех экспериментах по гравитационным нагрузкам топологические параметры ссДНК, рассчитанные по величине значений асимметрии и эксцесса цитометрических кривых использовались нами для оценки эффектов внутриядерных изменений ссДНК в лимфоцитах периферической крови испытуемых. После завершения трех циклов эксперимента результаты изменения топологических параметров ссДНК и активности митохондриальных ферментов в лимфоцитах крови испытуемых были следующими (см. табл. 1).

Таблица 1

Динамика изменений ссДНК и уровня дегидрогеназ в лимфоцитах крови испытуемых при гравитационных нагрузках ( $M \pm m$ ,  $n=24$ )

Этапы испытаний	Показатели, изучаемые в процессе испытаний					
	ИКН ссДНК, $I/I_0$		СДГ, гранул/кл.		$\alpha$ -ГФДГ, гранул/кл.	
	до	после	до	после	до	после
I	1,18 $\pm$ 0,02	1,27 $\pm$ 0,03*	14 $\pm$ 3	6,8 $\pm$ 3	12 $\pm$ 3	7 $\pm$ 3
II	1,18 $\pm$ 0,03	1,25 $\pm$ 0,02	10 $\pm$ 3	6 $\pm$ 3	7 $\pm$ 3	6 $\pm$ 3
III	1,14 $\pm$ 0,02	1,20 $\pm$ 0,02*	7 $\pm$ 2	5 $\pm$ 2	3 $\pm$ 2	5 $\pm$ 2

Примечание: \* -  $p < 0,05$ ; по сравнению с фоновыми значениями показателей ;  $I/I_0$  – относительная интенсивность флуоресценции «нуклеоидов».

Из данных таблицы видно, что повторные гравитационные нагрузки приводят к значительному понижению активности дегидрогеназ. При этом, уровень ИКН ссДНК после I-го и II-го цикла испытаний также возрастал по сравнению с исходным ( $p < 0,05$ ). Такое практически одномоментное снижение процессов анаэробного и аэробного энергообразования характерно при адаптации организма к неблагоприятному фактору, в течение воздействия которого происходит включение дополнительных резервных регуляторных систем. С другой стороны, изменение энергозатрат зависит от транскрипционной активности ДНК, которая уже непосредственно связана с топологическими преобразованиями ссДНК. При последующем анализе изменений топологии ссДНК и активности дегидрогеназ после 3-го, завершающего весь цикл испытаний, этапа видно, что увеличение степени гравитационной нагрузки приводит к дальнейшей перестройке внутриклеточных энергетических процессов. По-видимому, наряду с продолжающимся снижением процесса гликолиза происходит частичная компенсация энергозатрат за счет повышения активности других ферментов энергетического цикла, возможно, за счет пентозофосфатного шунта.

Следует отметить, что по завершении 3-го цикла абсолютные значения ИКН ссДНК меньше, чем после 2-го испытания. Однако, по сравнению с собственным контролем, т.е. величиной ИКН ссДНК, имевшейся перед началом 3-го испытания,

значения ИКН ссДНК оставались повышенными. Такая внутриклеточная перестройка процесса энергозатрат и параметров ссДНК свидетельствует о развитии фазы длительной активации в процессе адаптации к гравитационным перегрузкам.

Анализируя совокупные результаты внутриклеточных изменений структуры ссДНК и активности митохондриальных дегидрогеназ следует отметить, что на всех этапах испытаний не наблюдалось изменений ПСС ссДНК, которая численно не отличалась от контрольных значений (-0,058 сверхвитков/10 пар оснований), что свидетельствует об отсутствии структурных повреждений ДНК [2].

Результаты исследования состояния иммунной системы у испытуемых на всех этапах эксперимента представлены ниже (табл. 2-4).

Таблица 2

Изменение состояния иммунитета у испытуемых при гравитационных нагрузках ( $M \pm m$ )

Иммунологические показатели	1-й этап (n=24)	
	до испытаний	после испытаний
Лейкоциты $\times 10^9/\text{л}$	$5,8 \pm 0,3$	$6,1 \pm 0,3$
Лимфоциты $\times 10^9/\text{л}$	$2,04 \pm 0,27$	$2,11 \pm 0,3$
CD3 $\times 10^9/\text{л}$	$1,06 \pm 0,03$	$1,14 \pm 0,09$
CD8 $\times 10^9/\text{л}$	$0,5 \pm 0,21$	$0,49 \pm 0,24$
CD4 $\times 10^9/\text{л}$	$0,81 \pm 0,41$	$0,7 \pm 0,37$
В-лимфоциты $\times 10^9/\text{л}$	$0,24 \pm 0,03$	$0,27 \pm 0,06$
В-IgM+ $\times 10^9/\text{л}$	$0,06 \pm 0,02$	$0,06 \pm 0,02$
В-IgG+ $\times 10^9/\text{л}$	$0,12 \pm 0,02$	$0,13 \pm 0,02$
В-IgA+ $\times 10^9/\text{л}$	$0,04 \pm 0,01$	$0,06 \pm 0,02$
IgM г/л	$1,09 \pm 0,13$	$0,81 \pm 0,7$
IgG г/л	$13,78 \pm 3,44$	$19,32 \pm 4,1$
IgA г/л	$1,7 \pm 0,33$	$1,56 \pm 0,18$
C <sub>3</sub> г/л	$0,52 \pm 0,07$	$0,73 \pm 0,01$
РТМЛ с КонА, %	$61 \pm 3$	$88 \pm 3^{**}$
ЛКТ, усл.ед.	$1,32 \pm 0,13$	$1,4 \pm 0,14$
НСТст., усл. ед.	$1,35 \pm 0,16$	$0,47 \pm 0,18^{**}$

Примечание: \*\* -  $p < 0,02$ ; \* -  $p < 0,05$ ; по сравнению с фоновыми значениями показателей

Таблица 3

Изменение состояния иммунитета у испытуемых при гравитационных нагрузках ( $M \pm m$ )

Иммунологические показатели	2-й этап (n=24)	
	до испытаний	после испытаний

Лейкоциты × 10 <sup>9</sup> /л	6,1 ± 0,3	6,1 ± 0,3
Лимфоциты × 10 <sup>9</sup> /л	2,12 ± 0,25	2,14 ± 0,05
CD3 × 10 <sup>9</sup> /л	1,02 ± 0,2	1,03 ± 2
CD8 × 10 <sup>9</sup> /л	0,55 ± 0,13	0,44 ± 0,14
CD4 × 10 <sup>9</sup> /л	0,55 ± 0,13	0,49 ± 0,14
В-лимфоциты × 10 <sup>9</sup> /л	0,25 ± 0,07	0,29 ± 0,08
В-IgM+ × 10 <sup>9</sup> /л	0,08 ± 0,02	0,11 ± 0,02
В-IgG+ × 10 <sup>9</sup> /л	0,11 ± 0,04	0,11 ± 0,04
В-IgA+ × 10 <sup>9</sup> /л	0,04 ± 0,01	0,06 ± 0,01
IgM г/л	1,05 ± 0,16	1,63 ± 0,22
IgG г/л	12,2 ± 1,3	14,57 ± 1,85
IgA г/л	1,91 ± 0,04	1,63 ± 0,23
С <sub>3</sub> г/л	0,7 ± 0,07	0,63 ± 0,12
РТМЛ с КонА, %	85 ± 3	61 ± 7**
ЛКТ, усл.ед.	0,89 ± 0,07	0,90 ± 0,14*
НСТст., усл. ед.	1,27 ± 0,11	0,67 ± 0,09**

Примечание: \*\* - p<0,02); \* - p<0,05; по сравнению с фоновыми значениями показателей

Таблица 4

Изменение состояния иммунитета у испытуемых при гравитационных нагрузках (M±m)

Иммунологические показатели	3-й этап (n=24)	
	до испытаний	после испытаний
Лейкоциты × 10 <sup>9</sup> /л	6,2 ± 0,2	6,0 ± 0,2
Лимфоциты × 10 <sup>9</sup> /л	2,15 ± 0,23	2,07 ± 0,3
CD3 × 10 <sup>9</sup> /л	1,05 ± 0,02	0,99 ± 0,01
CD8 × 10 <sup>9</sup> /л	0,54 ± 0,18	0,43 ± 0,07
CD4 × 10 <sup>9</sup> /л	0,54 ± 0,19	0,43 ± 0,07
В-лимфоциты × 10 <sup>9</sup> /л	0,28 ± 0,06	0,29 ± 0,03
В-IgM+ × 10 <sup>9</sup> /л	0,13 ± 0,01	0,12 ± 0,01
В-IgG+ × 10 <sup>9</sup> /л	0,11 ± 0,02	0,1 ± 0,02
В-IgA+ × 10 <sup>9</sup> /л	0,04 ± 0,01	0,06 ± 0,01
IgM г/л	1,47 ± 0,11	1,73 ± 0,21
IgG г/л	12,11 ± 1,0	12,59 ± 1,95
IgA г/л	1,69 ± 0,1	1,52 ± 0,12
С <sub>3</sub> г/л	0,66 ± 0,09	0,62 ± 0,11
РТМЛ с КонА, %	81 ± 3	60 ± 6**
ЛКТ, усл.ед.	0,88 ± 0,10	1,08 ± 0,15*
НСТст., усл. ед.	0,73 ± 0,10	0,36 ± 0,12**

Примечание: \*\* - p<0,02); \* - p<0,05; по сравнению с фоновыми значениями показателей

Из данных таблиц следует, что выбранный нами режим гравитационных нагрузок не вызывает значимых изменений количества лейкоцитов и лимфоцитов в крови испытуемых.

Однако, система регуляции иммунитета с увеличением гравитационной нагрузки претерпевает значительную перестройку. Коэффициент дифференцировки (CD4/CD8) снижается до единицы, причем, в первую очередь, за счет процентного содержания Т-хелперов ( $p < 0,05$ ).

Наряду с этим происходит увеличение содержания сывороточного IgM. Кроме того, наблюдаются достоверные изменения ( $p < 0,02$ ) показателя РТМЛ после каждого этапа испытаний, являясь, таким образом, интегральным отражением нарушения регуляции содержания цитокинов. Следует также отметить снижение показателей неспецифической резистентности. Однако все перечисленные изменения не выходили за рамки физиологической нормы, демонстрируя, прежде всего, уровень адаптационного потенциала испытуемых.

Проведенный нами корреляционный анализ взаимосвязи между иммунологическими показателями после каждого этапа испытаний указывает на рост положительных связей к концу испытаний, что также свидетельствует о включении регуляторных звеньев адаптационного процесса [7, 16].

### **Выводы.**

1. В процессе адаптации организма испытуемых к хроническим гравитационным нагрузкам изменяется метаболизм иммунокомпетентных клеток и показатель ИКН ссДНК лимфоцитов.

2. Изменяется уровень цитокинов и хелпер-супрессорного звена иммунной системы, отражающее перестройку регуляторных систем организма человека при адаптации к хроническим перегрузкам.

3. Отсутствие изменений параметра ПСС ссДНК (-0,058 сверхвитков/10 пар оснований) указывает на структурную прочность генома в процессе адаптации человека к неблагоприятному воздействию хронических перегрузок.

### **Литература.**

1. Gomes E.C. Oxidants, Antioxidants, and the Beneficial Roles of Exercise-Induced Production of Reactive Species / E.C. Gomes, A.N. Silva, M.R. Oliveira // Oxidative Medicine and Cellular Longevity. – 2012. – Vol.2012 . – P.1-12.



2. Ващенко В.И. Сверхспиральная ДНК человека и животных при экстремальных воздействиях: автореф.дисс. ... д-ра биол. наук / В.И. Ващенко. – Л.: ВНИИ МЧС России, 2000. – 42 с.
3. Ващенко В.И. Оценка конформационных изменений суперспиральной ДНК эукариотических клеток методом прямой флюориметрии "нуклеоидов". I. Сравнительная информативность различных методов изучения нарушений структуры суперспиральной ДНК в тимоцитах и макрофагах / В.И. Ващенко, В.Е. Комар // Цитология. – 1986. – Т.28, №7.– С.750-754.
4. Ващенко В.И. Оценка эффектов ионизирующего излучения низкой интенсивности на иммунную систему генетически неоднородной популяции людей / В.И. Ващенко [и др.] // Тезисы докл. I Всесоюзного радиобиологического съезда.– М.: 1989.– Т.5.– С.1067-1068.
5. Ващенко В.И. Особенности изменений сверхспиральной ДНК и активности топоизомераз костного мозга человека, пригодного для миелотрансплантации / В.И. Ващенко [и др.] // Цитология. – 2004. – Т.46, №10.– С.903.
6. Смирнов В.С. Состояние иммунной системы у людей через 2 года после воздействия факторов радиационной аварии / В.С. Смирнов, В.И. Ващенко, В.Г. Морозов // Иммунология.– 1990.– №6.– С.63-65.
7. Новиков В.С. Коррекция функциональных состояний при экстремальных воздействиях / В.С. Новиков, Е.Б. Шустов, В.В. Горанчук .– СПб.: Наука, 1998.– 544 с.
8. Ларина И. М. Механизмы естественной вариабельности при адаптации физиологических систем человека к условиям космического полета / И. М. Ларина, А. М. Носовский, А. И. Григорьев // Физиология человека. – 2012. – Т.38, №2.– С.79-86.
9. Медицинские лабораторные технологии. Справочник / Под ред. проф. А.И. Карпищенко.– СПб.: Интермедика, 2002. – 600 с.
10. Смирнов В.С. Метод определения субпопуляций В-лимфоцитов на проточном цитометре / В.С. Смирнов, А.Н. Малков, К.Б. Булатов // Лабор.дело.– 1990.– №7.– С.60-53.
11. Пигаревский В.Е. / Зернистые лейкоциты и их свойства / В.Е. Пигаревский.– М.: Медицина, 1978.– 127 с.
12. Milner A.E. Measurument of DNA damage in mammalian cells using flow cytometry / A.E. Milner, A.T.M. Vaughan, I.P. Clark // Rad.Res.– 1987.– 110.– N 1.– P.108-117.
13. Генкин А.А. Новая информационная технология анализа медицинских данных (программный комплекс ОМИС) / А.А. Генкин.– СПб.: Политехника, 1999. – 191 с.
14. Cook P.R. Supercoils in human DNA / P.R. Cook, I.A. Brazel // J. Cell Sci.– 1975.– Vol.19.– P.261-279.

15. Thomas E.A. Nucleoid halo expansion indirectly measures DNA damage in single cells / E.A. Thomas, C.A. Thomas // *Exper.Cell Res.*– 1989.– Vol.183.– N 1.– P.149-158.
16. Гора Л.П. Экология человека / Л.П. Гора.– М.: Дрофа, 2007. – 483 с.