

## МОДИФИКАЦИЯ РАДИАЦИОННЫХ ЭФФЕКТОВ

УДК 615:576.367:612.112.94:614.875

### АНТИАПОПТОТИЧЕСКИЕ ЭФФЕКТЫ КОФЕИНА, ГЕНИСТЕИНА И ВЕРАПАМИЛА ПО ОТНОШЕНИЮ К УФ-ОБЛУЧЕННЫМ ЛИМФОЦИТАРНЫМ КЛЕТКАМ

© 2019 г. М. А. Наквасина<sup>1,\*</sup>, Е. В. Токмакова<sup>1</sup>, И. А. Колтаков<sup>1</sup>, В. Г. Артюхов<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Воронежский государственный университет, Воронеж, Россия

\*E-mail: nakvasina\_ma@mail.ru

Поступила в редакцию 01.10.2018 г.

Апоптоз лимфоцитов человека, индуцированный воздействием УФ-света (240–390 нм) в дозе 1510 Дж/м<sup>2</sup>, сопровождается значительным ростом внутриклеточного уровня активных форм кислорода в течение 1–2 ч после облучения. Добавление кофеина (10<sup>-4</sup> моль/л) и генистеина (10<sup>-6</sup> моль/л) к УФ-облученным лимфоцитам индуцирует снижение на 11 и 23% соответственно по сравнению с контролем количества клеток, находящихся на ранней стадии апоптоза. Антиапоптотические эффекты кофеина и генистеина по отношению к фотомодифицированным лимфоцитам связаны с их способностью снижать уровень активных форм кислорода в интактных и УФ-облученных клетках и инактивировать пероксид водорода. Верапамил (10<sup>-4</sup> моль/л), в отличие от действия кофеина и генистеина, не уменьшает количество лимфоцитов, находящихся на ранней стадии апоптоза, по сравнению с таковым для фотомодифицированных свободных клеток, но проявляет эффекты снижения уровня активных форм кислорода в иммуноцитах.

**Ключевые слова:** лимфоциты, УФ-свет, апоптоз, активные формы кислорода, кофеин, генистеин, верапамил

**DOI:** 10.1134/S0869803119050084

Выявление механизмов, путей реализации и способов регулирования программированной клеточной смерти (ПКС) — одна из ключевых проблем биофизики и биохимии клетки.

Апоптоз — энергозависимый, эволюционно-консервативный процесс клеточной гибели, инициируемый внешними и внутренними факторами (сигналами), сопровождающийся активацией специфических протеаз и нуклеаз, расщеплением белков и фрагментацией ядерной ДНК, образованием мембранных апоптозных телец, содержащих фрагменты ядра и цитоплазмы [1, 2].

Нами установлено [3], что УФ-свет (240–390 нм) в дозах 151 и 1510 Дж/м<sup>2</sup> индуцирует запуск рецепторного (Fas-зависимого) каспазного и p53-зависимого путей апоптоза лимфоцитов периферической крови доноров. На основании исследования уровня цитохрома c, изменений структурного состояния, величин мембранного потенциала митохондриальных мембран и активности сукцинатдегидрогеназы высказано предположение о возможности реализации апоптотической гибели лимфоцитов по митохондриальному механизму [4]. По-видимому, одними из медиаторов ПКС лимфоцитов в условиях УФ-облучения являются активные формы кислорода (АФК) и ионы кальция.

Соединения, способные изменять в клетках уровень АФК, свободного ионизированного кальция и влиять на функционирование отдельных компонентов сигналтрансдукторных систем, взаимодействующих с собственными сигнальными путями апоптоза, могут быть использованы в качестве регуляторов ПКС.

Верапамил — блокатор потенциалзависимых кальциевых каналов, модулятор фосфоинозитидного пути передачи информации в клетку [5, 6]. Кофеин — блокатор фосфодиэстеразы, разрушающей цАМФ, способный влиять на клеточный цикл и активность ключевых регуляторных белков, выступать в роли антиоксиданта или индуцировать апоптоз — соответственно в низких и высоких концентрациях [7–9]. Изофлавоноид генистеин — ингибитор протеинтирозинкиназы и топоизомеразы II, проявляющий антиоксидантную, антиангиогенную, противоопухолевую и иммуносупрессивную активность [10, 11].

С целью уточнения и детализации представлений о механизмах УФ-индуцированного апоптоза иммуноцитов, а также возможности его регулирования нами были исследованы структурно-функциональные модификации лимфоцитов человека после их УФ-облучения (240–390 нм) в

дозе 1510 Дж/м<sup>2</sup> и добавления верапамила, кофеина и генистеина.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДИКА

Объектом исследования стали лимфоцитарные клетки, выделенные из гепаринизированной крови доноров. Лимфоциты получали центрифугированием донорской крови в градиенте плотности фиколл-урографина ( $\rho = 1.077 \text{ г/см}^3$ ) [12]. Рабочая концентрация лимфоцитов —  $2 \times 10^6$  кл/мл.

УФ-облучение лимфоцитов, суспендированных в растворе Хенкса (рН 7.4), проводили при их непрерывном перемешивании в термостатируемой открытой стеклянной кювете при температуре  $20 \pm 1^\circ\text{C}$  с помощью ртутно-кварцевой лампы типа ДРТ-400. Расстояние от оси лампы до кюветы с образцом составляло 0.23 м. УФ-облучение клеток проводили через светофильтр УФС-1 с полосой пропускания 240–390 нм (со спектральными линиями: 253.7, 265.2, 280, 296.7, 302.2, 312.6, 365 нм). Интенсивность излучения лампы — 151 Дж/м<sup>2</sup> за 1 мин. Доза облучения лимфоцитов составляла 1510 Дж/м<sup>2</sup>. Объем вносимого в кювету образца — 1 мл.

Суспензии интактных и УФ-модифицированных лимфоцитов в растворе Хенкса инкубировали в микропробирках при 37°C в течение 1–2 ч в присутствии CO<sub>2</sub>.

Для определения количества апоптотических клеток в суспензии лимфоцитов использовали тест-систему для детекции апоптоза FITC Annexin V/Dead Cell Apoptosis Kit (“Invitrogen”, США) [13]. Исследования проводили на проточном цитометре Guavaeasy Cyte (Merk Millipore, США). Полученные данные обрабатывали при помощи программы In Cyte.

Уровень экспрессии CD95 на поверхности лимфоцитов определяли методом проточной цитофлуориметрии на цитометре Guavaeasy Cyte (Merk Millipore, США) при помощи набора FITC Mouse Anti-Human CD95 (“BD Pharmigen<sup>TM</sup>”, США).

Внутриклеточный уровень АФК исследовали флуоресцентным методом при помощи 2',7'-дихлорфлуоресцеин диацетата (DCFH-DA) на спектрофлуориметре Shimadzu RF-1501 (длина волны возбуждения — 480 нм, диапазон длин волн эмиссии образовавшегося в ходе реакции 2',7'-дихлорфлуоресцеина (DCF) — 524–525 нм) [14].

Уровень каталитической активности каталазы и глутатионредуктазы лимфоцитов определяли спектрофотометрическим методом при длинах волн соответственно 410 и 340 нм.

Число жизнеспособных лимфоцитов в пробах определяли методом эксклюзии трипанового синего [12].

Предварительно был проведен выбор концентраций используемых модификаторов таким образом, чтобы они не оказывали влияния на жизнеспособность нативных лимфоцитарных клеток. Для дальнейших экспериментов использовали растворы модификаторов в конечных концентрациях: верапамил ( $10^{-4}$  моль/л); кофеин ( $10^{-4}$  моль/л); генистеин ( $10^{-6}$  моль/л).

Растворы модификаторов добавляли к облученным суспензиям лимфоцитов через 1 мин после завершения процесса облучения.

Антирадикальную активность исследуемых модификаторов (верапамила, кофеина и генистеина) регистрировали по изменению интенсивности хемилюминесценции люминола на биохемилюминометре БХЛ-07. Инициация хемилюминесценции люминола происходит вследствие его окисления H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, ОН-радикалами, супероксидным анион-радикалом. Среда для определения антирадикальной активности модификаторов по отношению к пероксиду водорода содержала: 0.4 мл натрий-фосфатного буфера (рН 7.4 при 20°C); 0.1 мл раствора люминола ( $10^{-3}$  моль/л); 0.1 мл модификатора (раствор Хенкса — в случае контроля); 0.1 мл H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> в концентрации  $10^{-4}$  моль/л (вносимого перед измерением). Для изучения антирадикальной активности верапамила, кофеина и генистеина по отношению к ОН-радикалам использовали систему генерации гидроксильных радикалов по механизму Фентона [15]. В кювету хемилюминометра вносили 0.1 мл исследуемого модификатора (раствор Хенкса — в случае контроля); 0.4 мл натрий-фосфатного буфера (рН 7.4 при 20°C); 0.4 мл раствора FeSO<sub>4</sub> (0.05 моль/л; готовится непосредственно перед работой) и 0.1 мл раствора люминола ( $10^{-3}$  моль/л). Затем быстро вносили 0.1 мл раствора пероксида водорода ( $10^{-4}$  моль/л) и измеряли интенсивность хемилюминесценции в данной системе. Кинетическую кривую биохемилюминесценции регистрировали в течение 1 мин на БХЛ-07, определяли интенсивность вспышки I<sub>max</sub>. Конечные концентрации модификаторов в этих системах: верапамил ( $10^{-4}$  моль/л); кофеин ( $10^{-4}$  моль/л); генистеин ( $10^{-6}$  моль/л).

Статистическую обработку результатов экспериментов осуществляли с помощью набора электронных таблиц “Statgraphics”. Достоверность отличий контрольных и опытных значений долей лимфоцитов, находящихся на ранней стадии апоптоза и поздней стадии апоптоза или некроза, определяли с применением критерия согласия частот  $\chi^2$  (хи-квадрат); уровня АФК в лимфоцитах в присутствии верапамила, кофеина, генистеина и их антирадикальной активности — при помощи *t*-критерия Стьюдента [16].

## РЕЗУЛЬТАТЫ

На рис. 1 представлены результаты определения уровня активных форм кислорода в лимфоцитах сразу после УФ-облучения ( $1510 \text{ Дж/м}^2$ ) и через 1 и 2 ч после фотомодификации клеток. Зарегистрировано статистически значимое повышение содержания активных форм кислорода в облученных лимфоцитах по сравнению с таковым нативных клеток.

Обнаружено, что через 2 ч после УФ-облучения лимфоцитов наблюдается статистически значимое повышение по отношению к контролю ферментативной активности глутатионредуктазы (с 9 до 15 мкмоль/мин) и снижение – каталазы (со 160 до 130 мкмоль/мин) соответственно.

В ходе проведения проточно-цитофлуориметрического анализа выявлено снижение количества УФ-облученных клеток, находящихся на ранней стадии апоптоза, после добавления кофеина ( $10^{-4}$  моль/л) и генистеина ( $10^{-6}$  моль/л) по сравнению с таковым для фотомодифицированных клеток в отсутствие модификаторов (табл. 1).

Нами не были обнаружены статистически значимые отличия уровня экспрессии Fas-рецепторов (CD95) лимфоцитов через 1 ч после УФ-облучения и добавления модификаторов по сравнению с таковым для фотомодифицированных клеток.

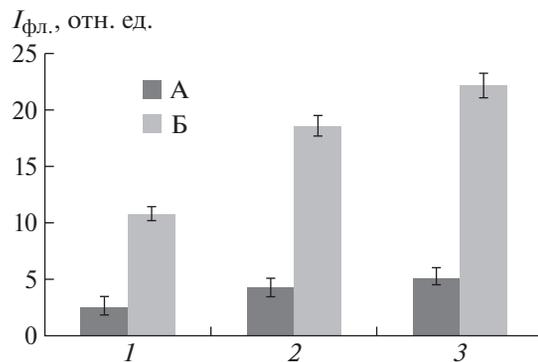
В табл. 2 представлены результаты определения количества АФК в лимфоцитарных клетках в присутствии растворов верапамила ( $10^{-4}$  моль/л), кофеина ( $10^{-4}$  моль/л) и генистеина ( $10^{-6}$  моль/л). Обнаружено, что добавление их к нативным лимфоцитам и последующая инкубация в течение 2 ч индуцируют статистически значимое снижение уровня АФК в лимфоцитарных клетках по сравнению с контролем.

**Таблица 1.** Данные проточно-цитофлуориметрического анализа количества фосфатидилсерин-позитивных лимфоцитов и лимфоцитов с поврежденной мембраной через 2 ч после УФ-облучения и добавления модификаторов

**Table 1.** Data of flow-cytofluorimetric analysis for the number of phosphatidylserine-positive lymphocytes and lymphocytes with a damaged membrane 2 h after UV-irradiation and the modifiers addition

Образец	Ранняя стадия апоптоза	Поздняя стадия апоптоза или некроза
УФ-облучение	$88.5 \pm 3.0\%$	$3.6 \pm 2.0\%$
УФ-облучение + верапамил	$87.8 \pm 5.0\%$	$3.7 \pm 1.0\%$
УФ-облучение + кофеин	$77.2 \pm 5.0\%^*$	$4.0 \pm 1.0\%$
УФ-облучение + генистеин	$65.4 \pm 3.0\%^*$	$3.3 \pm 1.5\%$

\* Отличия от контроля статистически значимы.



**Рис. 1.** Изменения уровня АФК после УФ-облучения лимфоцитов: 1 – уровень АФК в лимфоцитах сразу после облучения; 2 – уровень АФК в лимфоцитах через 1 ч после облучения; 3 – уровень АФК в лимфоцитах через 2 ч после облучения. А – интактные лимфоциты; Б – УФ-облученные лимфоциты.

**Fig. 1.** Changes in the level of ROS after UV-lymphocyte irradiation. Legend: 1 – ROS level in lymphocytes immediately after irradiation; 2 – ROS level in lymphocytes after 1 h after irradiation; 3 – ROS level in lymphocytes after 2 h after irradiation. A – intact lymphocytes; B – UV-irradiated lymphocytes.

Выявлено (табл. 2), что указанные соединения вызывают статистически значимое снижение внутриклеточного количества АФК в лимфоцитах через 2 ч после их УФ-облучения по отношению к таковому для фотомодифицированных клеток (контроль).

Установлено (табл. 2), что верапамил и генистеин в условиях экзогенной генерации гидроксильных радикалов индуцируют статистически значимое повышение интенсивности люминесценции люминола (в максимуме) по сравнению с контрольным образцом (люминол + система генерации ОН-радикалов). Кофеин ( $10^{-4}$  моль/л) вызывает статистически значимое снижение ин-

**Таблица 2.** Влияние верапамила, кофеина, генистеина на уровень АФК в лимфоцитах и интенсивность люминолзависимой хемилюминесценции в модельных системах**Table 2.** The effect of verapamil, caffeine, genistein on the level of ROS in lymphocytes and the intensity of luminol-dependent chemiluminescence in model systems

Исследуемый параметр	Контроль	Верапамил	Кофеин	Генистеин
Уровень АФК в интактных лимфоцитах ( $I_{\text{фл}}$ , отн.ед.)	7.3 ± 0.5	0.5 ± 0.2*	0.6 ± 0.3*	0.5 ± 0.3*
Уровень АФК в УФ-облученных лимфоцитах ( $I_{\text{фл}}$ , отн.ед.)	23.0 ± 0.9	2.0 ± 0.7*	2.5 ± 0.5*	3.0 ± 0.6*
Интенсивность люминолзависимой хемилюминесценции ( $I_{\text{мах}}$ , мВ) в условиях экзогенной генерации гидроксильного радикала	9.0 ± 1.0 (контроль – люминол + система генерации ОН-радикалов)	25.2 ± 0.9*	5.5 ± 0.8*	22.0 ± 0.6*
Интенсивность люминолзависимой хемилюминесценции ( $I_{\text{мах}}$ , мВ) в присутствии пероксида водорода	97.0 ± 5.0 (контроль – люминол + пероксид водорода)	37.2 ± 4.6*	21.0 ± 5.5*	42.0 ± 5.0*

\* Отличия от контроля статистически значимы.

тенсивности вспышки люминола по отношению к контролю в присутствии ОН-радикалов.

В присутствии пероксида водорода ( $10^{-4}$  моль/л) используемые модификаторы индуцируют статистически значимое снижение значения  $I_{\text{мах}}$  свечения люминола (табл. 2) по сравнению с контрольным образцом (люминол +  $\text{H}_2\text{O}_2$ ).

## ОБСУЖДЕНИЕ

Анализ полученных результатов позволяет заключить, что активные формы кислорода являются медиаторами УФ-индуцированного апоптоза лимфоцитов человека. Существенный рост внутриклеточной концентрации АФК после воздействия УФ-света на лимфоциты может быть связан со снижением активности и уровня антиоксидантных ферментов и низкомолекулярных антиоксидантов, дезактивирующих свободные радикалы кислорода, а также увеличением продукции АФК в митохондриях. По-видимому, обнаруженное нами падение активности каталазы в ходе реализации УФ-индуцированного апоптоза лимфоцитов приводит к нарастанию уровня  $\text{H}_2\text{O}_2$  – регулятора открывания пор в мембранах митохондрий (“депо” проапоптотических факторов) – и способствует усилению процессов программированной клеточной гибели иммуноцитов.

Установлено, что кофеин и генистеин снижают количество клеток, находящихся на ранней стадии апоптоза, инициируемого воздействием УФ-света, и тем самым проявляют антиапопто-

тический эффект по отношению к фотомодифицированным лимфоцитам.

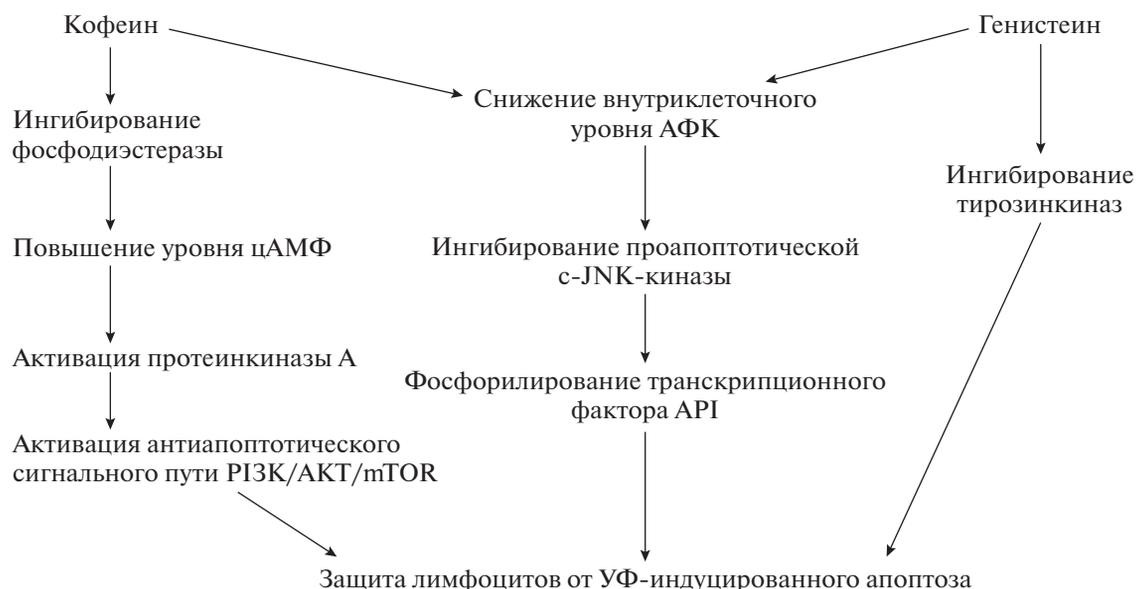
Вероятно, используемые соединения в выше-названных концентрациях не влияют на процессы реализации Fas-опосредованного пути УФ-индуцированного апоптоза лимфоцитов. По-видимому, тестируемые нами соединения оказывают влияние на другие механизмы реализации ПКС иммуноцитов, в частности, митохондриальный.

Установлено, что верапамил, кофеин и генистеин снижают уровень активных форм кислорода в интактных и УФ-облученных лимфоцитах.

Результаты экспериментов, направленных на выявление возможной антирадикальной активности модификаторов, позволили уточнить представления о механизмах снижения ими внутриклеточного содержания АФК: за счет их способности улавливать и инактивировать свободные радикалы (ОН-радикалы и пероксид водорода) или опосредованного действия.

Эффекты кофеина в отношении УФ-облученных лимфоцитов (снижение уровня АФК и количества ранних апоптотических клеток), наиболее вероятно, связаны с его антирадикальной активностью. Генистеин, по-видимому, проявляет антиапоптотическое действие по отношению к фотомодифицированным лимфоцитам за счет снижения уровня  $\text{H}_2\text{O}_2$  в иммуноцитах и, опосредованно, путем ингибирования тирозинкиназы.

Полученные нами данные согласуются с результатами ранее проведенных исследований, в которых выявлено радиопротекторное действие



**Рис. 2.** Возможные пути антиапоптотического действия кофеина и генистеина по отношению к УФ-облученным лимфоцитам.

**Fig. 2.** Possible ways of anti-apoptotic action of caffeine and genistein in relation to UV-irradiated lymphocytes.

кофеина и генистеина. В присутствии кофеина (0.02–1 ммоль/л) обнаружены эффекты уменьшения радиационно-химического выхода пероксида водорода и гидроксильного радикала в водных растворах и образования 8-оксогуанина в растворах ДНК при действии рентгеновского излучения *in vitro* [17]. Продемонстрировано радио-защитное действие генистеина на организм мышей и крыс, подвергнутых рентгеновскому облучению, по критериям выживаемости, состояния костномозгового кроветворения [18], гематологических показателей и цитокинового статуса [19], системы глутатиона и интенсивности ПОЛ эритроцитов периферической крови [20].

Верапамил ( $10^{-4}$  моль/л) снижает уровень кислородных метаболитов в облученных лимфоцитах и взаимодействует с пероксидом водорода в указанной концентрации, но не вызывает уменьшения количества клеток на ранней стадии УФ-индуцированного апоптоза, что инициирует в дальнейшем проведение экспериментов с применением более высоких его концентраций. Возможно, отсутствие антиапоптотического эффекта верапамила – блокатора кальциевых каналов – обусловлено запуском в условиях УФ-облучения лимфоцитов различных механизмов и путей реализации апоптоза: рецепторопосредованного, р53-зависимого, митохондриального, а также пути, связанного с нарушением гомеостаза кальция. Можно предположить, что блокирование кальциевых каналов плазматических мембран вызывает перераспределение ионов кальция между

клеточными компартментами (цитозоль, ЭПР, митохондрии, ядро), усиливающее процессы гибели лимфоцитов.

Антиапоптотический эффект кофеина и генистеина по отношению к УФ-облученным лимфоцитам обусловлен способностью данных веществ подавлять генерирование активных форм кислорода, а также, возможно, ингибированием этими модификаторами c-Jun-сигнального пути, запускающего программированную клеточную гибель (рис. 2).

Следовательно, кофеин и генистеин могут быть использованы в качестве агентов, регулирующих (ослабляющих) процессы УФ-индуцированной гибели лимфоцитов человека.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Green D.R., Liambi F. Cell Death Signaling // Gold Spring Harbor. Perspectives in Biology. 2015. <https://doi.org/10/1101/cshperspect.a006080>
2. Мартынова Е.А. Общие представления о роли сфинголипидов в сигнальных путях апоптоза // Патогенез. 2012. Т. 10. № 2. С. 16–28. [Martynova E.A. Obshhie predstavleniya o roli sfingolipidov v signal'nyh putjah apoptoza // Patogenez. 2012. T. 10. № 2. S. 16–28. (In Russian)]
3. Артюхов В.Г., Трубицына М.С., Наквасина М.А. и др. Пути реализации апоптоза лимфоцитов человека, индуцированного УФ-светом и активными формами кислорода // Радиационная биология. Радиационная биология. 2011. Т. 51. № 4. С. 425–443. [Artjuhov V.G.,

- Trubicyna M.S., Nakvasina M.A., Solov'eva E.V., Lidohova O.V.* Puti realizacii apoptoza limfocitov cheloveka, inducirovannogo UF-svetom i aktivnymi formami kisloroda // Radiac. biologija. Radioekologija. 2011. T. 51. № 4. S. 425–443. (In Russian)]
4. *Наквасина М.А., Лидохова О.В., Доманская Т.Л. и др.* Структурно-функциональные модификации лимфоцитов человека в динамике развития УФ-индуцированного их апоптоза // Радиационная биология. Радиоэкология. 2015. Т. 55. № 6. С. 616–624. [*Nakvasina M.A., Lidohova O.V., Domanskaja T.L., Artjuhov V.G., Rjazancev S.V.* Strukturno-funkcional'nye modifikacii limfocitov cheloveka v dinamike razvitija UF-inducirovannogo ih apoptoza // Radiac. biologija. Radioekologija. 2015. T. 55. № 6. S. 616–624. (In Russian)]
  5. *Degasperi G.R., Velho J.A., Zecchin K.G. et al.* Role of mitochondria in the immune response to cancer: A central role for  $Ca^{2+}$  // J. Bioenergetics. 2006. V. 38. P. 1–10.
  6. *De Petrillo P.B., Abernethy D.R., Wainer I.W., Andrawis N.S.* Verapamil decreases lymphocyte protein kinase C activity in humans // Clin. Pharmacol. & Therap. 1994. V. 55. № 1. P. 44–49.
  7. *Devasagayam T.P.* Caffeine as an antioxidant: inhibition of lipid peroxidation induced by reactive oxygen species // Biochim. Biophys. Acta. 1996. V. 1282. № 1. P. 63–70.
  8. *Geraets L.* Caffeine metabolites are inhibitors of the nuclear enzyme poly(ADP-ribose)polymerase-1 at physiological concentrations // Biochem. Pharmacol. 2006. V. 72. № 7. P. 902–910.
  9. *Bode Ann M.* The enigmatic effects of caffeine in cell cycle and cancer // Cancer Lett. 2007. V. 247. № 1. P. 26–39.
  10. *Kim I.G., Kim J.S., Lee J.H., Cho E.W.* Genistein decreases cellular redox potential, partially suppresses cell growth in HL-60 leukemia cells and sensitizes cells to  $\gamma$ -radiation-induced cell death // Mol. Med. Rep. 2014. V. 10. № 6. P. 2786–2792.
  11. *George J.* Genistein induces receptor and mitochondrial pathways and increases apoptosis during BCL-2 knockdown in human malignant neuroblastoma SK-N-DZ cells // J. Neurosci. Res. 2010. V. 88. № 4. P. 877–886.
  12. Лимфоциты. Методы / Под ред. Дж. Клауса. М., 1990. 395 с. [Limfocity. Metody / Pod red. Dzh. Klauusa. M., 1990. 395 s. (In Russian)]
  13. *Wlodkowic D.* Flow cytometry-based apoptosis detection // Meth. Molec. Biol. 2013. V. 559. P. 19–32.
  14. *Rastogi R.P., Singh S.P., Häder D., 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. 2012. V. 397. № 3. P. 603–607.
  15. *Goldstein S., Czapski G.* Mannitol as an  $OH^{\bullet}$  scavenger in aqueous solutions and in biological systems // Int. J. Radiat. Biol. 1984. V. 46. P. 725–729.
  16. *Калаева Е.А., Артюхов В.Г., Калаев В.Н.* Теоретические основы и практическое применение математической статистики в биологических исследованиях и образовании. Воронеж, 2016. 284 с. [*Kalaeva E.A., Artjuhov V.G., Kalaev V.N.* Teoreticheskie osnovy i prakticheskoe primenenie matematicheskoj statistiki v biologicheskikh issledovanijah i obrazovanii. Voronezh, 2016. 284 s. (In Russian)]
  17. *Попова Н.Р., Гудков С.В., Брусков В.И.* Природные пуриновые соединения как радиозащитные средства // Радиационная биология. Радиоэкология. 2014. Т. 54. № 1. С. 38–49. [*Popova N.R., Gudkov S.V., Bruskov V.I.* Prirodnye purinovyje soedinenija kak radiozashhitnye sredstva // Radiac. biologija. Radioekologija. 2014. T. 54. № 1. S. 38–49. (In Russian)]
  18. *Гребенюк А.Н., Башарин В.А., Тарумов Р.А. и др.* Экспериментальная оценка радиозащитной эффективности генистеина по показателям выживаемости и костномозгового кроветворения мышей, подвергнутых рентгеновскому облучению // Радиационная биология. Радиоэкология. 2013. Т. 53. № 5. С. 468–474. [*Grebenjuk A.N., Basharin V.A., Tarumov R.A., Aksenova N.V., Nazarov V.B., Kovtun V.Ju., Chekunov I.E.* Jeksperimental'naja ocenka radiozashhitnoj jeffektivnosti genisteina po pokazateljam vyzhivaemosti i kostnomozgovogo krovotvorenija myshej, podvergnutyh rentgenovskomu oblucheniju // Radiac. biologija. Radioekologija. 2013. T. 53. № 5. S. 468–474. (In Russian)]
  19. *Гребенюк А.Н., Тарумов Р.А., Башарин В.А. и др.* Экспериментальная оценка влияния синтетического генистеина на гематологические показатели и цитокиновый статус облученных крыс // Радиационная биология. Радиоэкология. 2015. Т. 55. № 2. С. 160–168. [*Grebenjuk A.N., Tarumov R.A., Basharin V.A., Pastushenkov V.L., Kovtun V.Ju.* Jeksperimental'naja ocenka vlijanija sinteticheskogo genisteina na gematologicheskie pokazateli i citokinovyj status obluchennyh krysov // Radiac. biologija. Radioekologija. 2015. T. 55. № 2. S. 160–168. (In Russian)]
  20. *Гребенюк А.Н., Тарумов Р.А., Башарин В.А., Ковтун В.Ю.* Экспериментальная оценка радиозащитной эффективности синтетического генистеина по показателям системы глутатиона и перекисного окисления липидов в эритроцитах периферической крови облученных крыс // Радиационная биология. Радиоэкология. 2015. Т. 55. № 5. С. 501–506. [*Grebenjuk A.N., Tarumov R.A., Basharin V.A., Kovtun V.Ju.* Jeksperimental'naja ocenka radiozashhitnoj jeffektivnosti sinteticheskogo genisteina po pokazateljam sistemy glutaciona i perekisnogo okislenija lipidov v jeritrocitah perifericheskoj krovi obluchennyh krysov // Radiac. biologija. Radioekologija. 2015. T. 55. № 5. S. 501–506. (In Russian)]

## Antiapoptotic Effects of Caffeine, Genistein and Verapamil in Relation to UV-Irradiated Lymphocyte Cells

M. A. Nakvasina<sup>a,#</sup>, E. V. Tokmakova<sup>a</sup>, I. A. Koltakov<sup>a</sup>, and V. G. Artyukhov<sup>a</sup>

<sup>a</sup>*Voronezh State University, Voronezh, Russia*

<sup>#</sup>*E-mail: nakvasina\_ma@mail.ru*

Apoptosis of human lymphocytes, induced by exposure to UV light (240–390 nm) at a dose of 1510 J/m<sup>2</sup>, is accompanied by a significant increase in the intracellular level of reactive oxygen species during 1–2 hours after irradiation. The addition of caffeine (10<sup>-4</sup> mol/l) and genistein (10<sup>-6</sup> mol/l) to UV-irradiated lymphocytes induces a decrease in the number of cells on the early stage of apoptosis by 11 and 23%, respectively, as compared to the control sample. The antiapoptotic effects of caffeine and genistein in relation to photomodified lymphocytes are related to their ability to reduce the level of reactive oxygen species in intact cells and UV-irradiated cells, as well as to inactivate hydrogen peroxide. Verapamil (10<sup>-4</sup> mol/l), in contrast to the effects of caffeine and genistein, does not reduce the number of lymphocytes that are on the early stage of apoptosis, as compared to that parameter for photomodified free cells, but it demonstrates the effects on reducing the levels of reactive oxygen species in immunocytes.

**Keywords:** lymphocytes, UV light, apoptosis, reactive oxygen species, caffeine, genistein, verapamil