



УДК 612.112.94:577.31:577.035

© 2007

Н. Ф. Гамалея, Е. Д. Шишко

**Дифференцированная циркадианная реакция на свет,
проявляемая Т клетками и большими гранулярными
лимфоцитами человека *in vitro***

(Представлено академиком НАН Украины Д. М. Гродзинским)

Recently we have shown that rhythmic daily fluctuations of the human blood lymphocyte ability to react with sheep erythrocytes (E_R activity) persisted in lymphocytes placed in culture under the dark conditions or day-time illumination. If the illumination was switched over to the night-time, the inversion of this circadian rhythm was observed. The results implied that lymphocytic cells contained a self-sustained light-responsive circadian clock. As E_R activity is characteristic of two lymphocyte subpopulations in human blood—T cells and large granular lymphocytes (LGL), we now studied the found circadian clock in enriched fractions of these lymphocyte subpopulations, isolated and maintained in culture separately. It was established that although circadian variations of the lymphocyte activity were evident in both cell fractions, the rhythms turned out light-entrainable only in the LGL one. However, when the two lymphocyte subpopulations were grown in a double-chambered vessel which allowed humoral exchange between them, T cell rhythms also became light-responsive, suggesting that a diffusible element of the photoreceptive/circadian system could be transferred from LGL onto T lymphocytes through a half-permeable membrane. The findings are discussed in the context of an apparent key role of the LGL in the proposed mechanism of non-visual circadian photoregulation in man.

Лимфоцитарные клетки обладают такими нетривиальными особенностями, как чувствительность к видимому свету [1–4] и ритмичное изменение в течение суток некоторых показателей [5–8]. Обычно эти два феномена исследовались независимо. Изучая световую регуляцию биоритмов, мы в самых ранних работах показали, что световая чувствительность лимфоцитов ограничена определенными участками спектра (синим, красным) [9], а позднее установили способность этих клеток к ритмичному проявлению активности даже вне организма — при культивировании *in vitro* [10]. В обоих исследованиях использовался один и тот же методический подход: определялось известное в иммунологии взаимодействие лимфоцитов человека с эритроцитами барана (реакция Е-розеткообразования — прикрепление эритроцитов к поверхности лимфоцитов), характеризующее активность CD2 антигена. Оказалось, что в течение суток эта активность ритмично колеблется даже в лимфоцитах, помещенных в культуру, т. е. наблюдается циркадианный ритм с максимумом вблизи полудня.

С другой стороны, было обнаружено, что красный или синий свет низкой интенсивности закономерно усиливает реакцию E-розеткообразования.

Недавно мы показали, что световая чувствительность лимфоцитов и ритмичность их активности связаны между собой [11]. Если при культивировании лимфоцитов в обычных условиях (в темноте) или в условиях дневного освещения максимальная активность клеток отмечалась среди дня, а минимальная — среди ночи, то при переключении освещения на ночное время наблюдалась инверсия циркадианного ритма активности со смещением ее максимума на полночь, а минимума — на полдень. Так, впервые было продемонстрировано наличие автономно функционирующих фоточувствительных биологических часов в периферических клетках человека.

Так как описанные опыты были поставлены на выделенных из крови мононуклеарных клетках, в состав которых входят две фракции E-розеткообразующих (E_R) лимфоцитов — T лимфоциты и большие гранулярные лимфоциты (БГЛ), в настоящей работе мы попытались оценить роль каждой из этих фракций в световой инверсии ритма E_R активности.

Мононуклеары, изолированные из свежезятой венозной крови доноров-мужчин как описано ранее [11], разделяли на фракции T лимфоцитов и БГЛ с помощью двухступенчатого градиента перколла [12] и дополнительной очистки фракции БГЛ от T клеток путем образования розеток высокоаффинными E_R лимфоцитами с последующим удалением их центрифугированием в градиенте плотности фиколл-верографина. Полученная в результате обогащенная фракция БГЛ содержала 80–82% этих клеток (по морфологическим критериям), а фракция T лимфоцитов была практически свободна от БГЛ ($< 0,1\%$). Условия культивирования клеток описаны в сообщении [11]. Для освещения культуральных флаконов свет проекционной лампы, пропущенный через синий фильтр (полоса пропускания 380–440 нм), направлялся в термостат с помощью фиброоптического световода. Клетки освещались сквозь плоское дно флакона при интенсивности на поверхности дна $0,5 \text{ Вт/м}^2$ по показаниям пироэлектрического фотометра ПТД разработки Института физики НАН Украины. Для установления циркадианных колебаний E_R активности клеток ее уровень определяли, как описано в [11], через каждые 4 часа в шести временных точках суток: 09:00; 13:00; 17:00; 21:00; 01:00 и 05:00.

Для выяснения влияния светового режима на ритм T клеток и БГЛ флаконы с каждой из этих лимфоцитарных фракций инкубировали в течение 5 сут либо в постоянной темноте (темновой контроль), либо при освещении в ночное время (с 20:00 до 08:00). После этого определяли циркадианный ритм E_R активности клеток (рис. 1). Во всех экспериментах, поставленных с привлечением четырех различных доноров, ритм БГЛ, подвергавшихся ночному освещению, оказался инвертированным по сравнению с темновым режимом культивирования этих клеток (см. рис. 1, б), при котором, как мы показали ранее [11], сохраняется ритм свежевыделенных клеток. В противоположность этому оба ритма T лимфоцитов — в темновой культуре и при освещении в ночное время, были одинаковы (см. рис. 1, в), т. е. обращения ритма при ночном освещении не происходило. Из рис. 1 видно, что характер ритма темновой культуры (а значит, исходных клеток) у T лимфоцитов был подобен, а у БГЛ практически противоположен ритму, неизменно получавшемуся в этом и в предыдущих [10, 11] исследованиях с неразделенными мононуклеарными клетками.

Согласно результатам экспериментов, из двух E_R лимфоцитарных фракций — БГЛ и T лимфоцитов, входящих в состав мононуклеарных клеток, только первые оказываются фотореактивными в тесте на световую инверсию ритма. Это казалось странным, если учесть, что БГЛ составляют только от 2 до 15% мононуклеарных клеток в крови человека [13]

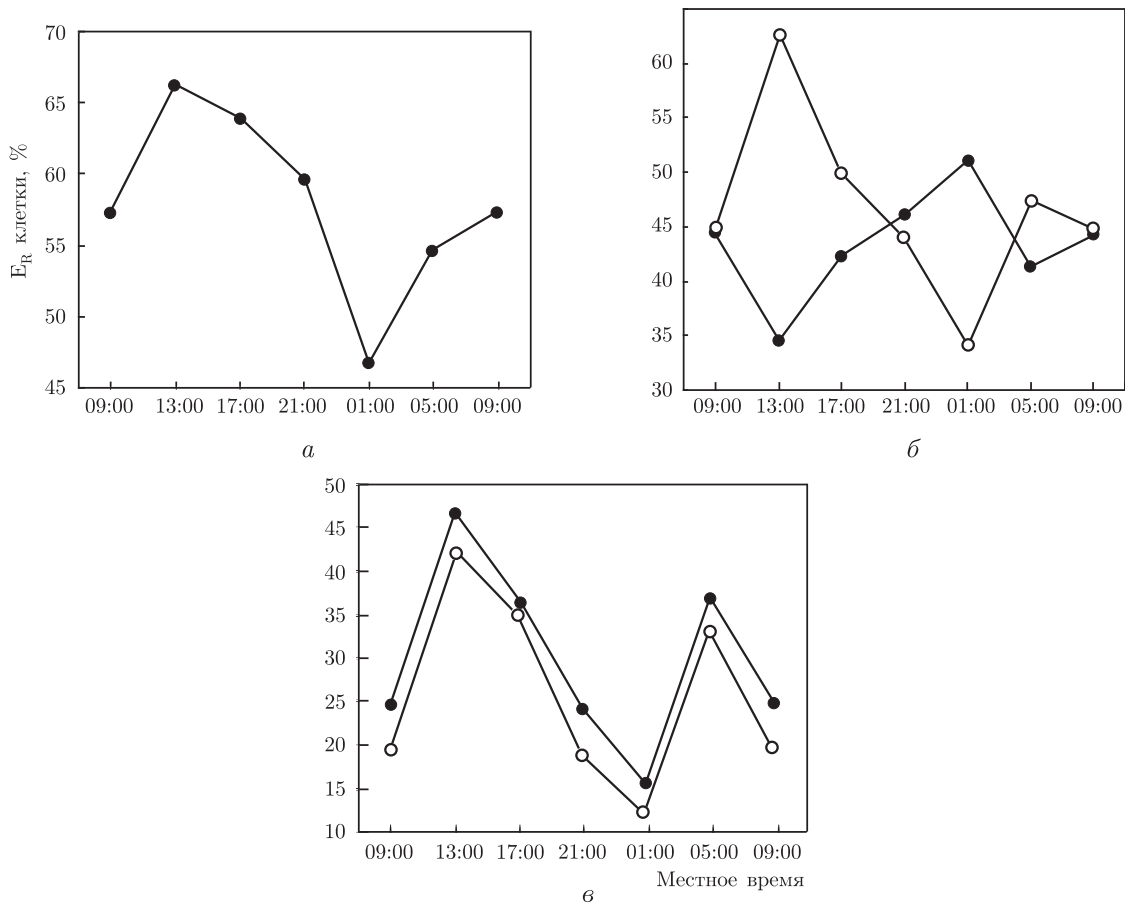


Рис. 1. Циркадианные ритмы E_R активности лимфоцитов после культивирования их в течение 5 сут: *а* — Мононуклеарные клетки (очищенные от моноцитов), культивировавшиеся в темноте; *б* — БГЛ, культивировавшиеся в темноте (●) или при освещении ночью (○); *в* — Т лимфоциты, культивировавшиеся в темноте (●) или при освещении ночью (○). Представлены типичные результаты одного из четырех аналогичных опытов, поставленных на крови четырех различных доноров

и что тем не менее в наших недавних исследованиях мононуклеары оказались способными к инверсии их ритма при ночном освещении [11]. Очевидно, что в опытах с неразделенной популяцией мононуклеарных лейкоцитов ритм E_R активности не мог бы приобрести инвертированный характер, если бы большинство клеток в популяции не отвечали на освещение. Одно из возможных объяснений этого парадокса состояло в фотосенсибилизации Т клеток, когда они росли в неразделенной мононуклеарной культуре, т. е. в присутствии БГЛ. Такое предположение подразумевало возможность переноса световоспринимающего материала с БГЛ на Т клетки.

Для проверки данной гипотезы мы в следующей серии экспериментов культивировали БГЛ и Т клетки в специальных двухкамерных сосудах, камеры которых разделены полупроницаемой мембраной (рис. 2). Питательная среда с клетками БГЛ была помещена в стеклянный цилиндр (диаметром 1,5 см), закрытый снизу нитроцеллюлозной мембраной (фильтры Супрог, размер пор 0,23 мкм) и погруженный в плоскодонный флакон (диаметр дна 2,5 см), в котором находилась среда с Т лимфоцитами (см. рис. 2). Мембрана фиксировалась на внутреннем цилиндре кольцом из силиконовой резины таким образом, что

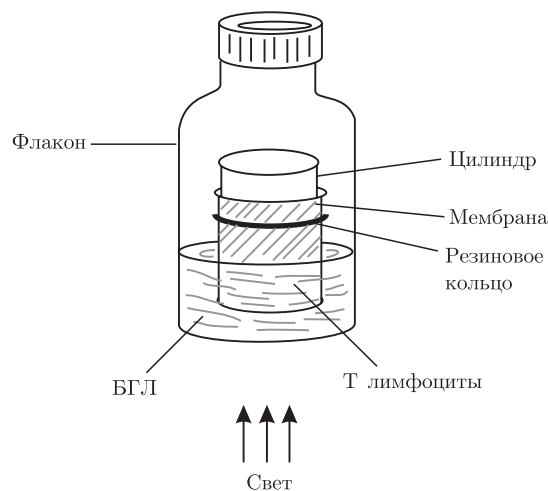


Рис. 2. Двухкамерный сосуд, использованный для совместного культивирования двух различных лимфоцитарных субпопуляций

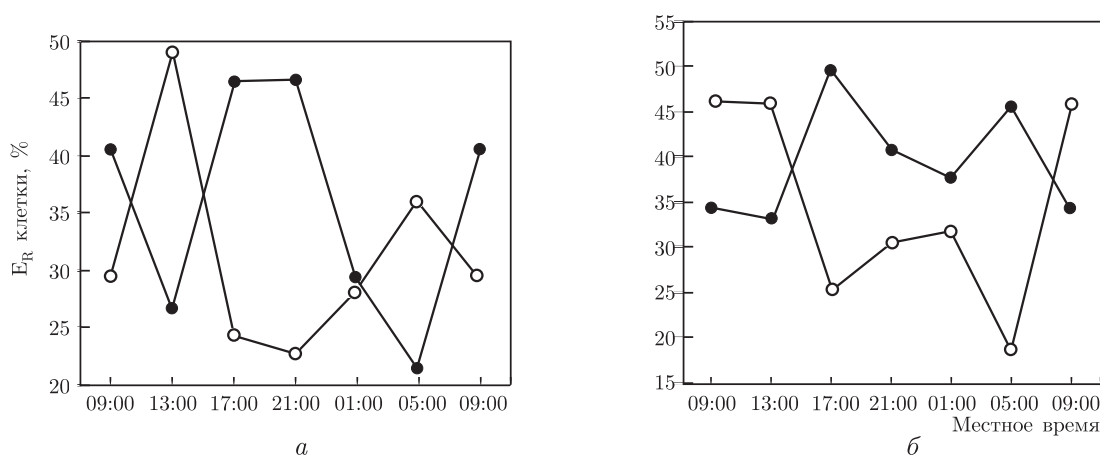


Рис. 3. Циркадианные ритмы E_R активности двух лимфоцитарных субпопуляций, культивировавшихся в течение 5 сут в двухкамерном сосуде: *a* — БГЛ, культивировавшиеся в темноте (●) или при освещении ночью (○); *б* — Т лимфоциты, культивировавшиеся в темноте (●) или при освещении ночью (○). Типичные результаты одного из трех аналогичных опытов, поставленных с тремя различными донорами

края мембраны были на 2,0–2,5 см выше уровня среды во флаконе. При всей простоте этот двухкамерный сосуд обеспечивал отдельное культивирование изучавшихся лимфоцитарных субпопуляций и возможность их обмена диффузионными биохимическими факторами. Анализ циркадианных ритмов у клеточных субпопуляций после 5 сут их совместного культивирования показал, что в таких условиях при ночном освещении Т клеток действительно наблюдалась инверсия их ритма (рис. 3, б): максимум и минимум E_R активности менялись местами точно так же, как это происходило с фракцией БГЛ (рис. 3, а).

Таким образом, полученные данные позволяют считать, что самоподдерживающиеся внутриклеточные циркадианные часы, обнаруженные нами ранее в опытах на неразделенной популяции мононуклеарных клеток из крови человека, присутствуют в обеих субпопуляциях E_R лимфоцитов — БГЛ и Т клеток. Однако состояние в них циркадианных часов, по-видимому, различно, и хронобиологическое значение этих двух ритмично функциони-

рующих лимфоцитарных субпопуляций может быть тоже неравноценным, причем главную роль следует отнести БГЛ. Если БГЛ на момент выделения клеток из крови, очевидно, содержат работоспособные фоторегулируемые биологические часы в полном составе (канал ввода внешнего регуляторного сигнала — центральный ритмозадающий осциллятор — выходной канал [14]), то в Т лимфоцитах, по-видимому, не работает канал ввода внешнего (светового) сигнала. Хотя проявление E_R активности в Т клетках подчинено циркадианному ритму, ночное освещение клеток не приводит к его инверсии. Такая невосприимчивость Т лимфоцитов к свету может быть вызвана потерей каких-то элементов фотовоспринимающей/сигналпередающей системы в процессе выделения клеток из крови. Однако в силу неспособности Т лимфоцитов восстановить их фотореактивность в процессе 5-дневного изолированного культивирования очевидно, что и в естественных условиях (в кровяном русле) световая регуляция этих клеток (если она действительно имеет место) возможна только благодаря соседству БГЛ. На вероятную причастность последних к ритмологическим механизмам физиологии человека косвенно указывает и способность БГЛ синтезировать гормон циркадианной регуляции мелатонин [15].

Одним из наиболее важных аспектов в приведенных данных является то, что они открывают новые подходы к изучению молекулярной природы фоточувствительности лимфоцитарных клеток. Так как в описанных выше опытах БГЛ оказались источником определенного гуморального фактора, который проникал сквозь мембрану и восстанавливал фотореактивность Т клеток, этот фактор потенциально может быть выделен и подвергнут анализу. Такая возможность в настоящее время изучается.

Работа выполнена в рамках темы НАН Украины “Особенности функционирования онкогена” № 0102U003228 и при финансовой поддержке Фонда фундаментальных исследований Министерства образования и науки Украины.

1. Karu T., Smolyaninova N., Zelenin A. Long-term and short-term responses of human lymphocytes to the He-Ne laser-radiation // *Lasers Life Sci.* – 1991. – 4, No 3. – P. 167–178.
2. Bolognani L., Costato M., Milani M. et al. Low-level laser light long term effects on human lymphocyte proliferation and partially inactivated enzyme reactivation // *SPIE Low-Energy Lasers Effects on Biological Systems.* – 1993. – 1883. – P. 75–82.
3. Kubasova T., Horvath M., Kocsis K., Fenio M. Effect of visible light on some cellular and immune parameters // *Immunol. Cell Biol.* – 1995. – 73. – P. 239–244.
4. Finocchiaro L. M. E., Polack E., Nahmod V., Glikin G. C. Sensitivity of human peripheral blood mononuclear leucocytes to visible light // *Life Sci.* – 1995. – 57. – P. 1097–1110.
5. Haus E. Biologic rhythms in hematology // *Path. Biol.* – 1996. – 44. – P. 618–630.
6. Suzuki S., Toyabe S., Moroda T. et al. Circadian rhythm of leucocytes and lymphocytes subsets and its possible correlation with the function of the autonomic nervous system // *Clin. Exp. Immunol.* – 1997. – 110. – P. 500–508.
7. Mazzocchi G., Bianco G., Correria M. et al. Circadian variation of lymphocyte subsets in healthy subjects // *Recent Progr. Med.* – 1998. – 89. – P. 569–572.
8. Akbulut H., Icli F., Buyukcelik A. et al. The role of granulocyte-macrophage-colony stimulating factor, cortisol, and melatonin in the regulation of the circadian rhythms of peripheral blood cells in healthy volunteers and patients with breast cancer // *Pineal Res.* – 1999. – 26. – P. 1–8.
9. Гамалея Н. Ф., Шлишко Е. Д., Яниш Ю. В. Новые данные по фоточувствительности животной клетки и механизму лазерной биостимуляции // *Докл. АН СССР.* – 1983. – 273, № 1. – С. 224–227.
10. Гамалея Н. Ф., Шлишко Е. Д., Косинская Н. П., Черный А. П. Суточные ритмы Е-розеткообразующей способности лимфоцитов человека // *Иммунология.* – 1990. – № 1. – С. 21–23.
11. Гамалея Н. Ф., Шлишко Е. Д. Первые данные о наличии фоточувствительных биологических часов в лимфоцитах крови человека // *Доп. НАН України.* – 2001. – № 6. – С. 181–185.
12. Timonen T., Ortaldo J. R., Herberman R. B. Characteristics of human large granular lymphocytes and relationship to natural killer and K cells // *J. Exp. Med.* – 1981. – 153. – P. 569–582.

13. Заж К. П., Киндзельский Л. П., Бутенко А. К. Большие гранулярные лимфоциты и патологические процессы. – Киев: Наук. думка, 1992. – 205 с.
14. Dunlap J. C. Molecular bases for circadian clocks // Cell. – 1999. – **96**. – P. 271–290.
15. Деденков А. Н., Райхлин Н. Т., Кветной И. М. и др. Иммуногистохимическая и электронно-микроскопическая идентификация серотонина, мелатонина и бета-эндорфина в гранулах натуральных киллеров // Бюл. эксперим. биологии и медицины. – 1986. – **102**, № 10. – С. 491–493.

Институт экспериментальной патологии,
онкологии и радиобиологии им. Р. Е. Кавецкого
НАН Украины, Киев

Поступило в редакцию 25.01.2007

УДК 576.12;595.1

© 2007

А. В. Гарбар, И. П. Онищук

Хромосомный гетероморфизм *Octolasion lacteum* (Oerley, 1885) (Oligochaeta, Lumbricidae) как результат гибридогенеза

(Представлено членом-корреспондентом НАН Украины И. А. Акимовым)

Karyotype Octolasion lacteum (Oerley, 1885) is studied. The chromosomal formula is $2n = 13m + 23sm + 2st = 38$; the fundamental number is $FN = 76$; and the total diploid complement length is $TCL = 176.91 \pm 14.22 \mu m$. The heteromorphism of the first chromosome pair which is represented by a large submetacentric and a smaller metacentric is discovered. Spermatogonial meiosis of this species has some violations. Only 12 bivalents (at $n = 19$) are discovered. The karyotype of this species is supposed to appear as a result of hybridization of the related species with the chromosome numbers $2n = 36$ and $2n = 40$.

Семейство Lumbricidae содержит более 200 видов. Около 20 из них являются космополитами, занесенными человеком во многие части света. Многие из этих видов представлены полиплоидными сериями и размножаются путем партеногенеза. Одним из таких видов является *Octolasion lacteum* (Oerley, 1885). Это единственный диплоидный представитель дождевых червей, для которого характерен облигатный партеногенез апомиктического типа [1].

Первые исследования кариотипа указанного вида, выполненные С. Мюльдалем в Великобритании в середине XX века [1], показали, что он характеризуется наивысшим во всем семействе Lumbricidae основным числом хромосом ($n = 19$). При этом все исследованные экземпляры характеризовались диплоидным набором хромосом ($2n = 38$). В работе [1] приводится первое описание морфологии митотических хромосом: 2 крупные хромосомы с соотношением между длинами плеч менее 1/2, 14 крупных V-образных хромосом и 22 небольших палочковидных хромосомы. Несколько экземпляров этого вида, полученных С. Мюльдалем из Швейцарии, в отношении хромосом ничем не отличались от собранных на Британских островах. Позже [2] была описана триплоидная ($3n = 54$) и тетраплоидная ($4n = 72$) формы этого вида из Италии.