

ИССЛЕДОВАНИЕ АКТИВНОСТИ МИТОХОНДРИАЛЬНЫХ ФЕРМЕНТОВ ЛИМФОЦИТОВ ЗДОРОВЫХ ДОНОРОВ И БОЛЬНЫХ ОСТРЫМ ПАНКРЕАТИТОМ В УСЛОВИЯХ УФ-ОБЛУЧЕНИЯ

О. В. Башарина, В. Г. Артюхов, И. А. Коробкина, Я. Г. Спахова

ФГБОУ ВПО «Воронежский государственный университет»

Поступила в редакцию 15.01.2018 г.

Аннотация. До настоящего времени остаются малоизученными многие аспекты физико-химических механизмов лечебного эффекта фотомодифицированной крови. УФ-свет как модулятор функциональной активности лимфоцитов приводит к изменению метаболизма клеток. Для полного понимания изменений метаболических путей в УФ-облученных лимфоцитах необходимо изучить более подробно процессы кислородного дыхания в митохондриях. Нами показано, что активность двух ключевых ферментов кислородного метаболизма – сукцинатдегидрогеназы и цитохром *c* оксидазы в лимфоцитах больных острым панкреатитом повышена в разной степени: активность СДГ незначительно выше контрольной величины, в то время как активность цитохром *c* оксидазы более чем в два раза выше значений, полученных для здоровых доноров. Такое изменение исследуемых параметров может указывать на нарушение функционирования митохондрий.

Изучена динамика активности данных митохондриальных ферментов в лимфоцитах. В ходе суточной инкубации клеток в питательной среде активность сукцинатдегидрогеназы не изменяется, при этом отмечен рост активности цитохром *c* оксидазы.

УФ-облучение суспензии лимфоцитов проводили в терапевтическом диапазоне доз (151 и 755 Дж/(м²·мин)). В фотомодифицированных лимфоцитах через сутки после их выделения из крови больных людей и воздействия УФ-света выявлено повышение активности сукцинатдегидрогеназы и снижение данного показателя для цитохром *c* оксидазы, данные изменения при этом носят дозозависимый характер. Такой характер динамики активности митохондриальных ферментов косвенно может указывать на нормализацию процесса кислородного дыхания в активированных в ходе воспалительного процесса лимфоцитах после воздействия на них УФ-света.

Динамика активности исследуемых ферментов после суточной инкубации необлученных и УФ-модифицированных клеток больных острым панкреатитом носит разнонаправленный характер. Характер изменений активности СДГ и ЦО в УФ-облученных лимфоцитах может указывать на улучшение их энергообеспечения по сравнению с лимфоцитарными клетками, не подвергавшимися воздействию УФ-света.

Таким образом, исследование метаболизма лимфоцитов позволяет выявить особенности реагирования иммуноцитов больных с деструктивно-воспалительными заболеваниями на воздействие УФ-излучения.

Ключевые слова: лимфоциты, острый панкреатит, УФ-свет, сукцинатдегидрогеназа, цитохром *c* оксидаза

Острый панкреатит (ОП) является одним из самых распространенных и тяжелых хирургических заболеваний, это форма асептического воспаления поджелудочной железы, в основе которого лежат некробиоз панкреатоцитов и ферментная аутоагрессия с последующим некрозом и дистрофией железы и присоединением вторичной гнойной инфекции. В основе острого панкреатита ле-

жит переход локального воспаления в системную воспалительную реакцию, которая в своем развитии проходит стадию активации эндотелиоцитов и клеток, участвующих в обеспечении неспецифической резистентности, с местной, а затем и системной продукцией первичных провоспалительных цитокинов [1, 2]. Летальность при данной патологии обусловлена в основном развитием тяжелых некротических форм, вызывающих системную воспалительную реакцию организма [3].

Аутотрансфузия УФ-облученной крови (АУФОК), как правило, приводит к улучшению иммунологического статуса организма и применяется при лечении ряда воспалительных заболеваний, в том числе, при ОП [4, 5]. Так, применение АУФОК-терапии, вне зависимости от группы больных острым холецистопанкреатитом, приводило к ослаблению воспалительного процесса в брюшной полости [6]. Наряду с уменьшением явлений воспаления в области операции выявлено уменьшение не только клинических проявлений острого панкреатита, но и снижение альфа-амилазной, фосфолипазной и протеазной активности в плазме крови [7].

В оценке функционального состояния лимфоцитов огромную роль играют метаболические показатели, клетки иммунной системы реагируют на воздействие различных факторов [8]. Показатели активности ферментов в лимфоцитах очень чувствительны к изменениям их состояния, поэтому они используются для дифференциальной диагностики и разработки прогноза течения заболеваний [9]. При заболеваниях воспалительного генеза происходит активация иммуноцитов, ликвидирующих очаг воспаления. Активированной клетке необходимо большое количество энергии, вследствие чего происходят изменения в функционировании митохондриальных ферментов для удовлетворения энергетических потребностей клетки. Изучение структуры и функции митохондрий в норме и при патологии существенно расширяет представления о возникновении и развитии многих патологических процессов на уровне клетки и организма в целом [10].

Сукцинатдегидрогеназа (СДГ) встроена во внутреннюю мембрану митохондрий, являясь одновременно комплексом II электронтранспортной цепи митохондрий и ферментом цикла Кребса. Следовательно, функционирование СДГ связано сразу с двумя ключевыми процессами энергетического метаболизма. По активности СДГ судят об интенсивности аэробного дыхания в клетках. Цитохром *c* оксидаза (ЦО) – ключевой фермент дыхательной цепи митохондрий эукариот. Модуляция ее активности может привести к деструктивным изменениям в митохондриях и, соответственно, к нарушению энергетического метаболизма клеток.

Метаболические показатели имеют высокую информативность для характеристики функционального состояния лимфоцитов, поэтому важно проводить исследования особенностей мета-

болизма лимфоцитов у больных людей, а также изменений метаболизма в условиях воздействия УФ-излучения на иммуноциты человека. Вопрос о метаболической регуляции функций иммуноцитов в настоящее время привлекает большое внимание. Много работ посвящено вопросам роли митохондриальных процессов в энергообеспеченности клеток и, следовательно, в осуществлении ими своих функций [11-13]. Поэтому исследование метаболизма фотомодифицированных лимфоцитов больных людей может способствовать выявлению особенностей реагирования иммунной системы в условиях воздействия УФ-излучения на организм человека. В связи с вышесказанным целью наших исследований явилось изучение динамики активности сукцинатдегидрогеназы и цитохром *c* оксидазы в УФ-облученных лимфоцитах больных острым панкреатитом.

МЕТОДИКА ЭКСПЕРИМЕНТА

Выделение лимфоцитов из периферической крови человека осуществляли путем ее центрифугирования в градиенте плотности фиколл-урографина ($\rho=1.077 \text{ г/см}^3$). УФ-облучение исследуемых образцов ($2 \cdot 10^6$ клеток/мл) проводили при их непрерывном перемешивании магнитной мешалкой в термостатируемой кювете ($20 \pm 1^\circ\text{C}$) с помощью ртутно-кварцевой лампы типа ДРТ-400 через светофильтр УФС-1 с полосой пропускания 240-390 нм в течение 1 и 5 мин. Доза облучения составляла 151 и 755 Дж/($\text{м}^2 \cdot \text{мин}$), что соответствует терапевтическому диапазону доз [4]. Нативные и облученные лимфоциты инкубировали в питательной среде RPMI-1640 в присутствии гентамицина при температуре 37°C в атмосфере с $[\text{CO}_2]=5\%$ в течение 24 часов.

Для определения активности ферментов клетки лизировали путем гипосмотического шока и с помощью дифференциального центрифугирования разделяли митохондрии и плазматические мембраны [14]. Активность сукцинатдегидрогеназы оценивали по уменьшению оптической плотности раствора при длине волны 600 нм, обусловленному обесцвечиванием дихлорфенолиндофенола в ходе его восстановления [15]. Каталитическую активность цитохром *c* оксидазы определяли по методу, принцип которого заключается в оценке скорости окисления цитохрома *c*, регистрируемой спектрофотометрически при длине волны 550 нм [15]. Все измерения проводили на спектрофотометре Shimadzu UV-2401 PC (Япония).

Статистическую обработку результатов исследований проводили с помощью пакета программ Statgraphics plus 3.0. Отличия величин тестируемых показателей в контрольных и опытных сериях оценивали с помощью метода попарной статистики, используя t-критерий Стьюдента, с уровнем значимости 5 %.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

У больных острым панкреатитом наблюдаются серьезные нарушения в углеводном обмене, что может привести к изменению работы митохондриальных ферментов [5]. Активность СДГ в лимфоцитах у больных ОП составляет 7.2 ± 0.12 мкмоль/(л·мин), что незначительно превышает контрольные значения, полученные для здоровых доноров (6.4 ± 0.08 мкмоль/(л·мин)).

Ранее нами было показано, что в нативных лимфоцитах здоровых доноров в ходе суточной инкубации происходит снижение активности СДГ и ЦО, с одновременным повышением активности ЛДГ [16]. В УФ-облученных клетках в ходе инкубации показатели активности СДГ и ЦО возрастают, причем эти параметры превышают соответствующие значения для нативных клеток. Переключение субстратного потока преимущественно на анаэробный путь является причиной уменьшения концентрации АТФ в ходе суточной инкубации нативных лимфоцитов [17].

После суточной инкубации лимфоцитов больных активность фермента не изменяется (рис. а), при этом в нативных клетках здоровых доноров

происходит снижение активности СДГ (с 6.4 до 5.4 мкмоль/(л·мин)) [16]. Воздействие УФ-света приводит к выраженному возрастанию активности СДГ в лимфоцитах больных людей через сутки после облучения.

Активность ЦО лимфоцитов больных острым панкреатитом составляет 3.41 ± 0.13 мкмоль/(л·мин), что значительно выше данного параметра в контрольных образцах (1.52 ± 0.09 мкмоль/(л·мин)). В ходе суточной инкубации необлученных лимфоцитов больных ОП наблюдается повышение активности ЦО (рис. б), в то время как в УФ-модифицированных клетках отмечено снижение активности фермента; это снижение более выражено при воздействии УФ-света в дозе 755 Дж/(м²·мин).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Активированным в ходе острого воспаления лимфоцитам требуется значительно больше энергии. Если потребление глюкозы Т-клетками будет ограничено, то гликолитический поток уменьшится до уровня, не способного поддерживать жизнеспособность клеток, что приведет к активации проапоптотических белков семейства Bcl-2, вызывающих клеточную гибель [18]. Как было показано нами ранее [19], активность гексокиназы в лимфоцитах большинства больных ОП значительно выше, чем у здоровых доноров; высокая активность данного фермента свидетельствует об усилении процесса гликолиза в лимфоцитах больных острым панкреатитом.

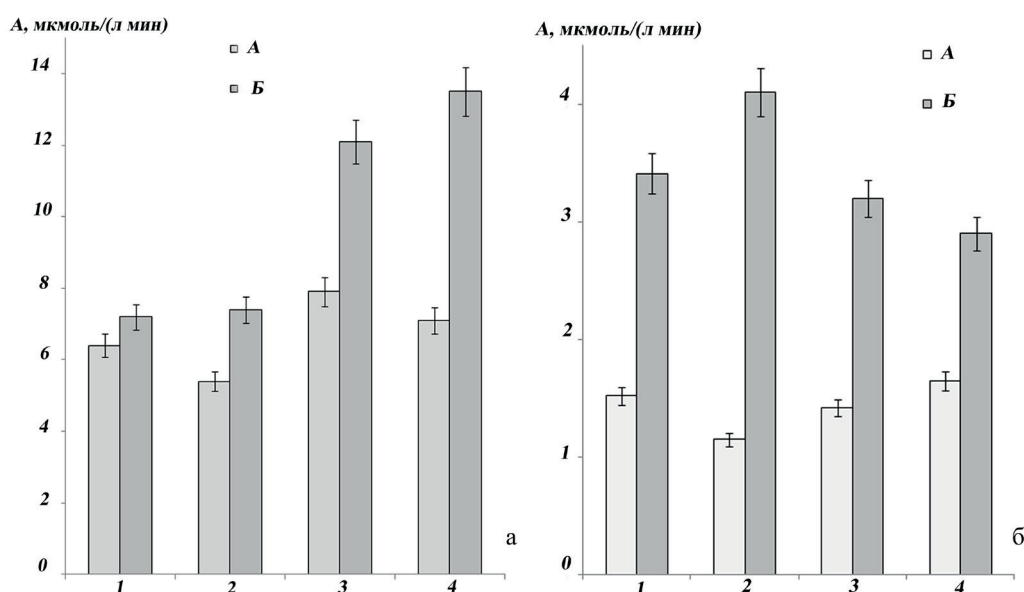


Рис. 1. Изменение активности СДГ (а) и ЦО (б) лимфоцитов здоровых доноров (А) и больных ОП (Б). Обозначения: 1 – клетки непосредственно после выделения, 2 - 4 – после суточной инкубации, 2 – без облучения, 3 и 4 – облучение в дозе 151 и 755 Дж/м² соответственно

При остром панкреатите часто наблюдается повышение уровня глюкозы в крови (это связано с изменениями структуры поджелудочной железы при ее воспалении) [20], вероятно, это одна из причин исходно повышенного уровня активности СДГ и ЦО.

В ходе инкубации фотомодифицированных лимфоцитов здоровых доноров наблюдается повышение активности как СДГ, так и ЦО, что свидетельствует об активации аэробного пути окисления глюкозы; это позволяет клеткам не только сохранить исходный уровень АТФ, но и снизить потребление глюкозы в энергетических целях [16]. Выявленное нами ранее повышение активности гексокиназы указывает на активацию окисления глюкозы в инкубированных клетках, причем в большей степени в фотомодифицированных клетках после их инкубации [19].

Воздействие УФ-света на лимфоциты как больных, так и здоровых людей приводит к повышению активности СДГ, но у больных эта активация более выражена: если у здоровых доноров повышение активности СДГ по сравнению с необлученными клетками после инкубации составляет около 50 %, то у больных данный параметр возрастает почти в два раза.

Активность ЦО у больных резко повышена; такое разобщение активности СДГ и ЦО может указывать на нарушения в работе митохондрий. После суточной инкубации УФ-облученных лимфоцитов больных и здоровых доноров динамика активности ЦО носит противоположный характер: активность ЦО у больных снижается, но все еще остается повышенной. При этом важно отметить, что разнонаправленное изменение активности СДГ (повышение) и ЦО (понижение) в фотомодифицированных лимфоцитах при сохранении высоких значений обоих исследуемых показателей (СДГ и ЦО) могут указывать на активацию синтеза АТФ в митохондриях больных острым панкреатитом и, таким образом, на улучшение энергообеспечения лимфоцитов больных.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Андреева С.Д., Машковцев О.В., Теплова Н.Н., Распутин П.Г., Заугольников В.С., Носач А.Ю., Шилов А.В. // Морфологические ведомости. 2009. Т. 1. № 1-2. С. 119-121.
2. Салиенко С.В., Маркелова Е.В., Сотниченко Б.А. // Цитокины и воспаление. 2006. Т. 5, № 4. С. 46-50.
3. Фирсова В.Г., Паршиков В.В., Градусов В.П. // Современные технологии в медицине. 2011. № 2. С. 127-134.
4. Карандашов В. И., Петухов Е. Б., Зродников В.С. Фототерапия. Москва, Медицина, 2001. 392 с.
5. Заривчацкий М.Ф., Власов А.П., Куданкин Р.М., Анашкин С.Г., Турыгина С.А., Месиков О.И. // Пермский медицинский журнал. 2014. Т. 31. № 2. С. 62-67.
6. Власов А.П., Заривчацкий М.Ф., Куданкин Р.М., Власов П.А., Муратова Т.А. // Современные проблемы науки и образования. 2015. № 1. С.1351-1359.
7. Власов А.П., Заривчацкий М.Ф., Куданкин Р.М., Кочеткова Т.А., Волкова М.В., Ярусова В.В. // Пермский медицинский журнал. 2015. Т. 32. № 2. С. 6-11.
8. Marelli-Berg F.M., Fu H., Mauro C. // Immunology. 2012. № 136(4). pp. 363-369.
9. Сергеева И.В., Киселев О.И. // Научное обозрение. 2015. № 18. С. 170-176.
10. Хундерякова Н.В., Захарченко А.В., Захарченко М.В., Мюллер Х., Федотчева Н.И., Кондрашова М.Н. // Биофизика. 2015. Т. 60. № 6. С. 1104-1108.
11. Pearce E.L., Pearce E.J. // Immunity. 2013. Vol. 38 (4). pp. 633 -643.
12. McGettrick A.F., O'Neill L. // J. Biol. Chem. 2013. Vol. 288, pp. 22893-22898.
13. Хундерякова Н.В., Плясунова С.А., Литвинова Е.Г., Ячкула Т.В., Захарченко М.В., Ковзан А.В., Федотчева Н.И., Шварцбург П.М., Кондрашова М.Н. // Биофизика. 2014. Т. 59. № 6. С. 1101-1107.
14. Прохорова М.И. Методы биохимических исследований: липидный и энергетический обмен. Ленинград, изд-во ЛГУ, 1982. 272 с.
15. Методы биологии развития, под ред. Т.А. Детлаф. Москва, Наука, 1974. 619 с.
16. Артюхов В.Г., Земченкова О.В., Башарина О.В., Ким Я.В. // Радиационная биология. Радиоэкология. 2011. Т. 51. № 2. С. 252-257.
17. Земченкова О.В., Артюхов В.Г., Башарина О.В., Ким Я.В. // Вестник Воронежского государственного университета. Сер. Химия. Биология. Фармация. 2011. № 1. С. 80-84 .
18. Maciver N.J., Jacobs S.R., Wieman H.L. // J. Leukoc. Biol. 2008. Vol. 84. № 4. pp. 949-957.
19. Башарина О.В., Артюхов В.Г., Зеленецкая М.Г., Коробкина И.А., Спахова Я.Г. // Вестник Воронежского государственного университета. Сер. Химия. Биология. Фармация. 2016. № 2. С. 37-40.
20. Яицкий Н.А., Седов В.М., Сопия Р.А. Острый панкреатит. Москва, МЕДпресс-информ, 2003, 224 с.

Воронежский Государственный Университет
**Башарина О. В., кандидат биол. наук, до-*
цент кафедры биофизики и биотехнологии
Тел.: +7 (473) 220-85-86
E-mail: bov-bio@yandex.ru

Voronezh State University
**Basharina O. V., PhD (Biology), Associate*
Professor, department of Biophysics and
Biotechnology
Ph.: +7 (473) 220-85-86
E-mail: bov-bio@yandex.ru

Артюхов В. Г., доктор биол. наук, профессор,
зав. кафедрой биофизики и биотехнологии

Artyukhov Valery G., PhD (Biology), Full
professor, Head of the Biophysics and Biotechnology
departmen,

Коробкина И. А., студентка кафедры биофи-
зики и биотехнологии

Korobkina Irina A., student, dept. of the Biophysics
and Biotechnology

Спахова Я. Г., студентка кафедры биофизики
и биотехнологии

Spakhova Y. G., student, dept. of the Biophysics
and Biotechnology

TO STUDY THE ACTIVITY OF MITOCHONDRIAL ENZYMES OF LYMPHOCYTES OF HEALTHY DONORS AND PATIENTS WITH ACUTE PANCREATITIS IN THE CONDITIONS OF UV IRRADIATION

O. V. Basharina, V. G. Artyukhov, I. A. Korobkina, I. G. Spakhova

Voronezh State University

Abstract. To date, many aspects of physico-chemical mechanisms of the therapeutic effect of photo-modified blood remain poorly studied. UV light as a modulator of lymphocyte functional activity leads to changes in cell metabolism. To fully understand the changes in metabolic pathways in UV-irradiated lymphocytes it is necessary to study in more detail the processes of oxygen respiration in mitochondria. We have shown that the activity of two key enzymes of oxygen metabolism – succinate dehydrogenase and cytochrome *c* oxidase in lymphocytes of patients with acute pancreatitis is increased to different degrees: the activity of SDG is slightly higher than the control value, while the activity of cytochrome *C* oxidase is more than twice higher than the values obtained for healthy donors. Such a change in the parameters studied may indicate a malfunction of the mitochondria.

Dynamics of activity of these mitochondrial enzymes in lymphocytes was studied. During incubation of cells for 24 hours in the nutrient medium, the activity of succinate dehydrogenase does not change, with an increase in the activity of cytochrome *c* oxidase.

UV irradiation of lymphocyte suspension was carried out in the therapeutic dose range (151 and 755 J/(m²·min)). In photomodified lymphocytes a day after their release from the blood of patients and exposure to UV light revealed increased activity of succinate dehydrogenase and a decrease in this indicator for cytochrome *c* oxidase, these changes are dose-dependent. This nature of the dynamics of mitochondrial enzyme activity may indirectly indicate the normalization of oxygen respiration in activated lymphocytes during the inflammatory process after exposure to UV light.

Dynamics of activity of the studied enzymes after incubation for 24 hours of unirradiated and UV-modified cells of patients with acute pancreatitis is the opposite. The nature of changes in the activity of SDG and cytochrome *c* oxidase in UV-irradiated lymphocytes may indicate the improvement of their energy supply, compared with the lymphocytic cells which were not exposed to UV light.

Thus, the study of the metabolism of lymphocytes allows to identify features of the response of the immune cells of patients with destructive inflammatory diseases on exposure to UV radiation.

Keywords: lymphocytes, acute pancreatitis, UV-light, succinate dehydrogenase, cytochrome *C* oxidase

REFERENCES

1. Andreeva S.D., Mashkovtsev O.V., Teplova N.N., Rasputin P.G., Sapelnikov V.S., Khanin A.Yu., Shilov V.A., Morphological statements. 2009. Vol.1. № 1-2. pp. 119-121.
2. Salienko S.V., Markelova E.V., Sotnichenko B.A., Cytokines and inflammation. 2006. Vol. 5, No. 4. pp. 46-50.
3. Firsova V.G., Parshikov V.V., Gradusov V.P., Modern technologies in medicine. 2011. No. 2. pp. 127-134.
4. Karandashov V.I., Petukhov E.B., Zrodnikov V.S. Phototherapy. Moscow, Medicine, 2001. 392 p.
5. Zarivchatsky M.F., Vlasov A.P., Kudankin R.M., Anaskin S.G., Turygina S.A., Mesikov O.I., Perm medical journal. 2014. T. 31. No. 2. pp. 62-67.
6. Vlasov A.P., Zarivchatsky M.F., Kudankin R.M., Vlasov P.A., Muratova T.A., Modern problems of science and education. 2015. No. 1. pp. 1351-1359.
7. Vlasov A.P., Zarivchatsky M.F., Kudankin R.M., Kochetkova T.A., Volkova M.V., Yarusova V.V., Perm medical journal. 2015. Vol. 32. No. 2. pp. 6-11.
8. Marelli-Berg F.M., Fu H., Mauro S., Immunology. 2012. No. 136 (4). pp. 363-369.
9. Sergeeva I.V., Kiselev O.I., Scientific review. 2015. No. 18. pp. 170-176.
10. Khunderyakova N.V., Zakharchenko A.V., Zakharchenko M.V., Muller H., Fedotcheva N.I., Kondrashova M.N., Biophysics. 2015. Vol. 60. No. 6. pp. 1104-1108.
11. Pearce E.L., Pearce E.J., Immunity. 2013. Vol. 38 (4). pp. 633 -643.
12. McGettrick A.F., O'Neill L., J. Biol. Chem. 2013. Vol. 288, pp. 22893-22898.
13. Khunderyakova N.V., Plyasunova S.A., Litvinova E.G., Yachkula T.V., Zakharchenko M.V., Kovzan A.V., Fedotcheva N.I., Shvartsburg P.M., Kondrashova M.N., Biophysics. 2014. Vol. 59. No. 6. pp. 1101-1107.
14. Prokhorova M.I. Methods of biochemical research: lipid and energy metabolism. Leningrad, LSU publishing house, 1982, 272 p.
15. Methods of development biology, edited by Detlaf T.A. Moscow, Nauka, 1974. 619 p.
16. Artyukhov V.G., Zemchenkova O.V., Basharina O.V., Kim Y.V., Radiation biology. Radioecology. 2011. T. 51. No.2. pp. 252-257.
17. Zemchenkova O.V., Artyukhov V.G., Basharina O.V., Kim, Y.V., Bulletin of Voronezh state University. Ser. Chemistry. Biology. Pharmacy. 2011. No. 1. pp. 80-84 .
18. MacIver N.J., Jacobs S.R., Wieman H.L., J. Leukoc. Biol. 2008. Vol. 84. No. 4. pp. 949-957.
19. Basharina O.V., Artyukhov V.G., Zelenetskaya M.G., Korobkina I.A., Spakhova Y.G., Bulletin of Voronezh state University. Ser. Chemistry. Biology. Pharmacy. 2016. No. 2. pp. 37-40.
20. Yaitsky N.A., Sedov V.M., Sapia R. A. Acute pancreatitis. Moscow, Medpress-inform, 2003, 224 P.