

ИЗМЕНЕНИЕ ФЕРМЕНТАТИВНОЙ АКТИВНОСТИ МИТОХОНДРИАЛЬНОЙ СУКЦИНАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ И ЦИТОХРОМ С ОКСИДАЗЫ ПОСЛЕ ВОЗДЕЙСТВИЯ МОНООКСИДА УГЛЕРОДА НА ЛИМФОЦИТЫ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА

О. И. Тюнина¹, В. Г. Артюхов², Е. В. Дорохов¹

**ФГБОУ ВО «Воронежский государственный медицинский университет им. Н.Н. Бурденко»*

ФГБОУ ВО «Воронежский государственный университет»

Поступила в редакцию 27.03.2018 г.

Аннотация. В последнее время в научном мире особый интерес представляет новый класс регуляторных молекул, а именно газовые посредники, к которым относят NO и CO, а также H₂S, образующиеся в клетках организма. Молекулы газомедиаторов осуществляют как межклеточную, так и внутриклеточную регуляцию разных физиологических функций. Работы о регуляторной роли CO в программируемой клеточной гибели лимфоцитов, единичны. Нами исследовано воздействие монооксида углерода (60, 75 и 90 мин., что соответствует 0.004; 0.005 и 0.006 мг/л HbCO) на функциональные свойства ключевых ферментов метаболизма лимфоцитов крови доноров: сукцинатдегидрогеназы (СДГ) и цитохром с оксидазы (ЦО). Используемые для модификации исследуемых клеток концентрации CO не превышали физиологического уровня содержания этого лиганда в крови здоровых лиц. Показано, что при действии монооксида углерода на лимфоциты крови человека наблюдается увеличение активности СДГ (через 75 мин.), а затем восстановление ее до первоначальных значений (90 мин.). После 24 ч. инкубации СО-модифицированных иммунокомпетентных клеток (75 мин.), наблюдалось статистически значимое снижение активности изучаемого фермента. Установлено, что активность ЦО в течение всего времени инкубации в атмосфере монооксида углерода (60, 75 и 90 мин.) не изменялась. Однако после 24 ч. инкубации СО-модифицированных (90 мин.) образцов выявлено увеличение активности митохондриальной ЦО. В результате проведенных исследований выявлено, что в наших условиях монооксид углерода не вызывал изменений электрон-транспортной цепи митохондрий, что могло бы привести к снижению активности АТФ-зависимых ферментов и как следствие – изменению мембранного потенциала клетки. Таким образом, используемые нами физиологические концентрации СО не давали предпосылок к развитию программируемой клеточной гибели за счет активации митохондриального пути. Проведенные исследования нашей лаборатории позволяют предположить единый механизм блокирования апоптоза иммунокомпетентных клеток после воздействия монооксида углерода (60, 75 и 90 мин.).

Ключевые слова: лимфоциты, монооксид углерода, цитохром с оксидаза, сукцинатдегидрогеназа.

Изучение влияния монооксида углерода (СО) на процессы окислительного фосфорилирования в результате изменения функционирования митохондрий представляет собой значительный интерес. Цитотоксические свойства СО долгое время объяснялись с позиций его разобщающего влияния на функционирование дыхательной цепи митохондрий [1]. В последнее время накопилось большое количество данных биохимических исследований, доказывающих роль митохондрий во внутриклеточных сигнальных путях, ведущих

к апоптозу клетки [2, 3, 4]. Митохондрии состоят из двух мембран, внешней и внутренней, которые разделены межмембранным пространством. В нем собраны белки, которые индуцируют гибель клеток, после того как они высвобождаются в цитоплазму. К этим белкам относятся цитохром с, апоптозиндуцирующий фактор (AIF), DIABLO и др. Цитохром с – один из ключевых ферментов дыхательной цепи митохондрий и, одновременно, один из важных белков, участвующих в реализации митохондриального пути апоптоза. В обычных условиях он удерживается в митохондриях кардиолипином.

Электронно-транспортная дыхательная цепь митохондрий – это система структурно и функционально связанных трансмембранных белков, включающих: I комплекс (NADH дегидрогеназа), комплекс II (сукцинатдегидрогеназа), комплекс III (цитохром bc_1) и комплекс IV (цитохром c оксидаза).

Известно, что оксид углерода (II) вступает во взаимодействие, в первую очередь, с железосодержащими биологически активными системами организма (гемопротеинами): цитохромоксидазой – цитохромом a_3 , цитохромом P-450, цитохромом c , каталазой, пероксидазой, сукцинатдегидрогеназой [5, 6]. Следует отметить, что конечный эффект воздействия CO на апоптоз определяется не только типом исследуемых клеток, а также концентрацией и временем воздействия его на клетки [7]. В связи с вышесказанным, целью нашей работы было изучение изменений функциональной активности митохондриальных ферментов (сукцинатдегидрогеназы и цитохром c оксидазы) лимфоцитов крови человека после воздействия монооксида углерода (60, 75 и 90 мин.) в физиологических концентрациях до и после их суточного термостатирования.

МЕТОДИКА ЭКСПЕРИМЕНТА

Выделение лимфоцитов из периферической крови доноров осуществляли путем ее центрифугирования в градиенте плотности фиколл-урографина ($\rho = 1.077 \text{ г/см}^3$) по методу A. Voium [8].

Суспензию лимфоцитарных клеток ($1 \cdot 10^6$ клеток/мл) помещали в атмосферу оксида углерода (II), который получали лабораторным способом по химической реакции между концентрированными серной и муравьиной кислотами в колбе с закрытой крышкой и газоотводной трубкой [9]. Эти кислоты смешивали в соотношении 1:1. Воздействие монооксидом углерода на исследуемые клетки крови длилось 60, 75 и 90 мин.

Количество образовавшегося монооксида углерода определяли спектрофотометрическим методом [10] по содержанию карбоксигемоглобина в гепаринизированной крови доноров. Оптическую плотность растворов карбоксигемоглобина человека измеряли при $\lambda = 538$ и 550 нм с помощью спектрофотометра «Shimadzu RF-5301 PC» (Япония). Исходная концентрация HbCO в нативной крови составила 0.3%, а после 60 мин пропускания CO через ее образец она достигла значения 0.6%, через 75 мин – 0.8%, через 90 мин – 0.9%, что соответствует 0.002; 0.004; 0.005 и 0.006 мг/л

HbCO соответственно. Таким образом, используемые для модификации исследуемых клеток концентрации CO не превышали физиологического уровня содержания этого лиганда в крови здоровых лиц [11].

Нативные и CO-модифицированные лимфоциты инкубировали в питательной среде RPMI-1640 в течение 24 ч. при температуре 37°C (термостат ТС-80М, 5 % CO_2 , 95 % относительной влажности).

Для определения активности митохондриальных ферментов клетки лизировали путем гипоосмотического шока. Для этого супернатант лимфоцитов ($1 \cdot 10^6$ клеток/мл) смешивали в соотношении 1:1 с дистиллированной водой и помещали в холодильник на 30 мин. По прошествии времени центрифугировали при 6000 об/мин на центрифуге MiniSpin в течение 10 мин для осаждения мембран лимфоцитов. Затем добавляли к полученному супернатанту иммуноцитов в соотношении 1:4 сахарозную (0.25 моль/л) среду выделения, содержащую 0.2 моль/л Трис-HCl и 1 моль/л ЭДТА ($\text{pH}=7.4$). Для удаления не полностью разрушенных клеток и ядер образцы центрифугировали 10 мин при 7400 об/мин. Для осаждения митохондрий надосадочную жидкость центрифугировали при 14000 об/мин 15 минут на центрифуге с охлаждением Jouan MR 23i. Для выявления максимальной активности ферментов, локализованных в митохондриальном пространстве или на внутренней поверхности мембран, митохондрии разрушали непосредственно перед анализом с помощью не ионного детерминанта тритона X-100: к осадку митохондрий добавляли 0.5 мл 0.1% раствора X-100 и выдерживали на холоде 30 мин [12].

Активность СДГ определяли методом, основанном на использовании искусственных акцепторов электронов. Среда определения представляла собой 0.1 моль/л натрий-фосфатного буфера ($\text{pH}=7.4$), содержащий 0.08 моль/л дихлорфенолинфенола (ДХФИФ), 1 ммоль/л феназинметасульфата (ФМС), 2 ммоль/л азида натрия и 20 ммоль/л сукцината натрия. В опытную пробу добавляли 200 мкл среды определения и 100 мкл разрушенных митохондрий лимфоцитов, в контроль – 100 мкл 0.1% раствора тритона X-100. Активность фермента оценивали спектрофотометрически по уменьшению оптической плотности среды при длине волны 600 нм в течение 1 мин и выражали в мкмоль/л·мин [13].

Каталитическую активность цитохром c оксидазы определяли по скорости окисления цитох-

рома с, регистрируемой спектрофотометрически при длине волны 550 нм [13]. Для определения начальной оптической плотности в спектрофотометрическую кювету помещали 200 мкл 0.1% раствора тритона X-100 и 100 мкл 0.1 ммоль/л раствора цитохрома с. На втором этапе измерения в кювету добавляли 200 мкл 0.1 моль/л натрий-фосфатного буфера (рН=7.4) и 100 мкл разрушенных митохондрий, регистрируя конечную оптическую плотность. Каталитическую активность цитохром с оксидазы выражали в мкмоль/л·мин. Все измерения проводили на спектрофотометре «Shimadzu RF-5301 PC» (Япония).

Статистическую обработку результатов исследований проводили с помощью пакета программ «Microsoft Excel».

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Каталитическая активность сукцинатдегидрогеназы (СДГ) в митохондриальной фракции нативных лимфоцитов крови человека составила 7.2 ± 0.8 мкмоль/л·мин. Через 75 мин. воздействия СО на иммунциты наблюдается статистически значимое возрастание анализируемого показателя на 33.3% до значения 9.6 ± 0.5 мкмоль/л·мин относительно контроля. После экспозиции лимфоидных клеток с монооксидом углерода в течение 60 и 90 мин. активность митохондриальной СДГ не изменялась (Табл. 1).

Таблица 1.

Ферментативная активность митохондриальной сукцинатдегидрогеназы СО-модифицированных лимфоцитов до и после их суточного термостатирования

Условия опыта	Ферментативная активность СДГ, мкмоль/л·мин	Ферментативная активность СДГ через 24 ч., мкмоль/л·мин
Контроль	7.2 ± 0.8	6.6 ± 1.4
60 мин.	5.9 ± 0.5	$9.5 \pm 1.4^{*}.$
75 мин.	$9.6 \pm 0.5^{*}$	$6.8 \pm 1.7^{**}$
90 мин.	7.6 ± 0.7	5.7 ± 1.8

*отклонения исследуемого показателя от контроля статистически значимы; **отклонения исследуемого показателя от измерений после инкубации в атмосфере монооксида углерода статистически значимы.

Суточная инкубация лимфоцитов при 37 °С не приводила к статистически значимым изменениям каталитической активности СДГ лимфоцитов крови человека. У объектов, модифицированных СО в течение 60 мин., и дальнейшего нахождения в термостате 24 ч., выявлено статистически значимое увеличение активности СДГ на 31.9% по сравнению с контролем и на 61.0% по сравнению

с соответствующими образцами без термостатирования. После 24 ч. инкубации иммунокомпетентных клеток, СО-модифицированных воздействием монооксида углерода в течение 75 мин., наблюдалось статистически значимое снижение активности изучаемого фермента на 29.2% соответственно относительно таких же образцов, не подвергшихся суточному инкубированию в питательной среде. Уменьшение активности фермента СДГ в митохондриальной фракции суспензии СО-модифицированных клеток после ее повышения, возможно, обусловлено нарушением конформации активного центра фермента, что сказывается, в свою очередь, на уменьшении его ферментативной активности. СДГ, являясь по своей структуре железосерофлавопротеином, содержит в составе Fe-S-кластеры и сульфгидрильные группы. Вероятно, взаимодействие СО с SH-группами или повреждение Fe-S-центров белка может приводить к конформационным изменениям фермента. Известно, что у монооксида углерода – высокое сродство к ионам железа.

Повышение внутриклеточной концентрации монооксида углерода влияет на жизнедеятельность митохондрий и имеет существенное значение как при физиологических, так и патологических состояниях. В работах А. Sandouka et al. [16] показано, что СО способен улучшать респираторный индекс изолированных митохондрий и снижать развитие окислительного стресса.

Воздействие монооксида углерода в течение 60, 75 и 90 мин. на лимфоциты крови человека не приводило к статистически значимому изменению активности ЦО относительно величины интактного контроля (Табл. 2).

Таблица 2.

Ферментативная активность митохондриальной цитохром с оксидазы СО-модифицированных лимфоцитов до и после их суточного термостатирования

Условия опыта	Ферментативная активность ЦО, мкмоль/л·мин	Ферментативная активность ЦО через 24 ч. инкубации, мкмоль/л·мин
Контроль	1.4 ± 0.3	1.0 ± 0.2
60 мин.	1.4 ± 0.1	1.4 ± 0.3
75 мин.	1.5 ± 0.2	1.8 ± 0.2
90 мин.	1.6 ± 0.1	$1.9 \pm 0.1^{*}.$

*отклонения исследуемого показателя от контроля статистически значимы; **отклонения исследуемого показателя от измерений после инкубации в атмосфере монооксида углерода статистически значимы.

Суточная инкубация нативных иммунокомпетентных клеток при 37 °С в термостате не индуцировала изменений каталитической активности

ЦО митохондрий по сравнению с интактными образцами. В процессе сохранения иммуноцитов в питательной среде RPMI-1640 в течение суток выявлено увеличение активности митохондриальной ЦО на 35.7% у СО-модифицированных в течение 90 мин. образцов относительно контроля и на 18.8% по сравнению с образцами без суточной инкубации.

Повышение уровня СО в клетке сопровождается активацией растворимой гуанилатциклазы и увеличением образования из ГТФ цГМФ, активацией цГМФ-зависимой протеинкиназы G и фосфорилированием ее белковых субстратов, модулирующих активность калиевых и кальциевых каналов, приводя к уменьшению внутриклеточной концентрации кальция. При этом меняется не только активность, но и регуляторные и каталитические свойства ферментных систем [14, 15, 17].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате проведенных исследований установлено, что в наших условиях монооксид углерода не вызывал изменений электрон-транспортной цепи митохондрий, что могло бы привести к снижению активности АТФ-зависимых ферментов и как следствие – изменению мембранного потенциала клетки. Таким образом, используемые нами физиологические концентрации СО не давали предпосылок к развитию программируемой клеточной гибели за счет активации митохондриального пути. Проведенные исследования нашей лаборатории позволяют предположить единый механизм блокирования апоптоза иммунокомпетентных клеток после воздействия монооксида углерода (60,75 и 90 мин.) [18, 19, 20].

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Kajimura M., Fukuda Ryo, Bateman R. M., Yamamoto T., Suematsu M. // *Antioxidants & Redox signaling*. 2010. Vol. 13. pp. 57-193.
2. Коржов В.И., Видмаченко А.В., Коржов М.В. // *АМН Украины*. 2010. Т. 6. № 1. С. 23-27.
3. Skulachev V.P. // *IUBMB life*. 2000. Vol. 49. pp. 365-373.
4. Zoratti M., Szabo Y. // *Biochem. Biophys Acta*. 1995. Vol. 1241. 39 p.
5. Овсепян Л.М., Казарян Г.С., Захарян Г.В. // *Медицинская наука НАН РА*. 2009. №2. С. 3-10.
6. Страйер Л. Биохимия. Москва, Мир, 1985, Т. 2, 400 с.
7. Новицкий В.В., Рязанцева Н.В., Старикова Е.Г., Таширева Л.А. // *Вестник науки Сибири*. 2011. №1. С. 635-640.
8. Кэтти Д. Антитела. Методы. Москва, Мир, 1991, ч. 2, 380 с.
9. Грандберг И.И. Органическая химия. Москва, Дрофа, 2002. 672 с.
10. Крамаренко В.Ф., Собчук Б.А., Гладышевская Т.Н., Сыщанко Г.А. О количественном определении карбоксигемоглобина и карбоксимиоглобина. Москва, МЗ СССР, 1974, 17 с.
11. Калетина М.И. Токсикологическая химия. Метаболизм и анализ токсикантов. Москва, ГЭОТАР-Медиа, 2008, 76 с.
12. Прохорова М.И. Методы биохимических исследований: липидный и энергетический обмен. Ленинград, ЛГУ, 1982, 272 с.
13. Детлаф Т.А. Методы биологии развития. Москва, Наука, 1974, 619 с.
14. Inguaggiato P., Gonzalez-Michaca L., Croatt A. J., Haggard J. J., Alam J., Nath K. A. // *Kidney Int*. 2001. Vol. 60. pp. 2181-2191.
15. Zuckerbraun B.S., Billiar T.R. // *J. Exp. Med*. 2003. Vol. 198. pp. 707-1716.
16. Sandouka A., Balogun E., Foresti R., Mann B.E., Johnson T.R., Tayem Y., Green C.J., Fuller B., Motterlini R. // *Cell Mol. Biol*. 2005. Vol. 51. №4. pp. 425-432.
17. Артюхов В.Г., Тюнина О.И. // *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. 2016. Т. 162. № 9. С. 348-351.
18. Артюхов В.Г., Путинцева О.В., Бахметьева-Тюнина О.И., Костенко С.М., Дубова С.М. // *Радиационная биология. Радиоэкология*. 2014. Т. 54, №3. С. 1–8.
19. Артюхов В.Г., Тюнина О.И., Дорохов В.Г. // *Экология человека*. 2016. №7. С. 37-43.
20. Тюнина О.И. Дисс. канд. биол. наук. Воронеж, 2015, 27 с.

ФГБОУ ВО Воронежский Государственный Медицинский Университет им. Бурденко Н.Н.

Тюнина О. И., к.б.н. доцент кафедры нормальной физиологии

Тел.: +7 920 214-24-68

E-mail: olgaivanovnat@inbox.ru

Voronezh state medical University N. N. Burdenko Tyunina O. I., PhD (Biology), associate prof.,

Department of normal physiology

Ph.: +7 920 214-24-68

E-mail: olgaivanovnat@inbox.ru

Дорохов Е. В., доцент кафедры нормальной физиологии

Dorokhov E. V., MD., DSci., associate prof., Department of normal physiology

Воронежский государственный университет
Артюхов В.Г., д.б.н., профессор кафедры био-
физики и биотехнологии

Voronezh state University
Artyukhov V. G., PhD (Biology), DSci.,
Full Professor, Department of Biophysics and
biotechnology

THE CHANGE OF ENZYMATIC ACTIVITY OF MITOCHONDRIAL SUCCINATE DEHYDROGENASE AND CYTOCHROME C OXIDASE AFTER EXPOSURE TO CARBON MONOXIDE ON HUMAN BLOOD LYMPHOCYTES

O. I. Tyunina¹, V. G. Artyukhov², E. V. Dorokhov¹

¹Voronezh state medical University N. N. Burdenko

²Voronezh state University

Abstract. Recently, in the scientific world of particular interest is a new class of regulatory molecules, namely gas intermediaries, which include NO and CO, as well as H₂S, formed in the cells of the body. Molecules of gas consumers carry out both intercellular and intracellular regulation of different physiological functions. Work on the regulatory role of CO in the programmable cell death of lymphocytes, isolated. We studied the effects of carbon monoxide (60, 75 and 90 min., corresponding to 0.004; 0.005 and 0.006 mg/l HbCO) on the functional properties of key enzymes in the metabolism of donor blood lymphocytes: succinate dehydrogenase (SDG) and cytochrome *c* oxidase. The CO concentrations used for modification of the studied cells did not exceed the physiological level of this ligand in the blood of healthy individuals. It is shown that under the action of carbon monoxide (60, 75 and 90 min.) on human blood lymphocytes, there is an increase in the activity of SDG (after 75 min.), and then its restoration to initial values. After 24 hours incubation of CO-modified immunocompetent cells (75 min.), there was a statistically significant decrease in the activity of the studied enzyme. It was found that the activity of cytochrome *c* oxidase during the incubation time in the atmosphere of carbon monoxide (60, 75 and 90 minutes) did not change. However, after 24 hours of incubation of CO-modified (90 min.) samples, an increase in mitochondrial cytochrome *c* oxidase activity was revealed. As a result of the conducted researches it is revealed that in our conditions carbon monoxide did not cause changes of electron transport chain of mitochondria that could lead to decrease in activity of ATP-dependent enzymes and as a consequence-change of membrane potential of a cell. Thus, the physiological concentrations of CO used by us did not give prerequisites for the development of programmable cell death due to the activation of the mitochondrial pathway. Our laboratory studies suggest a single mechanism for blocking the apoptosis of immunocompetent cells after exposure to carbon monoxide (60.75 and 90 minutes).

Keywords: lymphocytes, carbon monoxide, cytochrome *c* oxidase, succinate dehydrogenase.

REFERENCES

1. Kajimura M., Fukuda Ryo, Bateman R. M., Yamamoto T., Suematsu M., Antioxidants & Redox signaling, 2010, Vol. 13, pp. 57-193.
2. Korzhov V.I., Vidmachenko A.V., Korzhov M.V. AMN Ukrainy, 2010, Vol. 6, No. 1, pp. 23-27.
3. Skulachev V.P., IUBMB life, 2000, Vol. 49, pp. 365-373.
4. Zoratti M., Szabo Y., Biochem. Biophys Acta, 1995, Vol. 1241, 39 p.
5. Ovsepjan L.M., Kazarjan G.S., Zaharjan G.V., Medicinskaja nauka NAN RA, 2009, No. 2, pp. 3-10.
6. Strajer L. Biohimija. Moskva, Mir, 1985, Vol. 2, 400 p.
7. Novickij V.V., Rjazanceva N.V., Starikova E.G., Tashireva L.A. Vestnik nauki Sibiri, 2011, No. 1, pp. 635-640.
8. Kjetty D. Antitela. Metody. Moskva, Mir, 1991, pt. 2, 380 p.

9. Grandberg I.I. Organicheskaja himija. Moskva, Drofa, 2002, 672 p.
10. Kramarenko V.F., Sobchuk B.A., Gladyshevskaja T.N., Sycjanko G.A. O kolichestvennom opredelenii karboksigemoglobina i karboksimioglobina. Moskva, MZ SSSR, 1974, 17 p.
11. Kaletina M.I. Toksikologicheskaja himija. Metabolizm i analiz toksikantov. Moskva, GJeOTAR-Media, 2008, 76 p.
12. Prohorova M.I. Metody biohimicheskikh issledovanij: lipidnyj i jenergeticheskij obmen. Leningrad, LGU, 1982, 272 p.
13. Detlaf T.A. Metody biologii razvitija. Moskva, Nauka, 1974, 619 p.
14. Inguaggiato P., Gonzalez-Michaca L., Croatt A. J., Haggard J. J., Alam J., Nath K. A., Kidney Int., 2001, Vol. 60, pp. 2181-2191.
15. Zuckerbraun B.S., Billiar T.R., J. Exp. Med., 2003, Vol. 198, pp. 707-1716.
16. Sandouka A., Balogun E., Foresti R., Mann B.E., Johnson T.R., Tayem Y., Green C.J., Fuller B., Motterlini R. Cell Mol. Biol., 2005, Vol. 51, No. 4, pp. 425-432.
17. Artjuhov V.G., Tjunina O.I. // Bjulleten' jeksperimental'noj biologii i mediciny, 2016, Vol. 162, No. 9, pp. 348-351.
18. Artjuhov V.G., Putinceva O.V., Bahmet'eva-Tjunina O.I., Kostenko S.M., Dubova S.M. Radiac. biologija. Radiojekologija, 2014, Vol. 54, No. 3, pp. 1-8.
19. Artjuhov V.G., Tjunina O.I., Dorohov V.G. Jekologija cheloveka, 2016, No. 7, pp. 37-43.
20. Tjunina O.I. Disc. cand. biol. nauk. Voronezh, 2015, 27 p.