

## ОСОБЕННОСТИ ФУНКЦИОНИРОВАНИЯ КЛЮЧЕВЫХ ФЕРМЕНТОВ МЕТАБОЛИЧЕСКИХ ПУТЕЙ В УФ-МОДИФИЦИРОВАННЫХ ЛИМФОЦИТАХ ДОНОРСКОЙ КРОВИ

О. В. Башарина<sup>1</sup>, О. В. Земченкова<sup>2</sup>, В. Г. Артюхов<sup>1</sup>, М. Г. Помясова<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Воронежский государственный университет

<sup>2</sup>Воронежский государственный медицинский университет имени Н.Н. Бурденко

Поступила в редакцию 05.09.2018 г.

**Аннотация.** Способность лимфоцитов к изменению активности ферментов разных этапов метаболизма отражает адаптационные возможности клеток и свидетельствует об их функциональной активности. Нами показано, что под действием УФ-облучения происходят значительные изменения энергетического метаболизма лимфоцитов. Обнаружено, что в ходе суточной инкубации лимфоцитов активность ключевого фермента гликолиза – гексокиназы – повышается, причем это увеличение более выражено в УФ-облученных (240 – 390 нм) лимфоцитах; данное повышение активности фермента не связано с его синтезом *de novo*. В фотомодифицированных лимфоцитах выявлена также активация одного из ключевых ферментов пентозофосфатного пути – глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы (Г6ФД). Возрастание активности Г6ФД при действии интегрального потока УФ-света обусловлено действием длинноволнового УФ-света ( $\lambda_{\text{max}} = 365$  нм) на лимфоциты; в данном процессе основную роль играет синтез исследуемого фермента *de novo*.

В фотомодифицированных лимфоцитах в сравнении с необлученными наблюдается преобладание аэробного пути окисления глюкозы, что согласуется с выявленным нами эффектом повышения активности гексокиназы в лимфоцитах после их УФ-облучения. Способность клеток к изменению активности ферментов дихотомического и пентозофосфатного путей окисления глюкозы отражает адаптационные возможности клеток и свидетельствует о наличии сложных механизмов регуляции их функциональной активности. На основании проведенных экспериментов и с использованием наших более ранних результатов, представленных в ряде статей, а также учитывая данные литературы, мы разработали схему процессов, протекающих в лимфоцитах в ходе их фотомодификации и последующей инкубации.

После УФ-облучения суспензии лимфоцитов возможны разные пути реакции клеток на внешнее воздействие: гибель лимфоцитов путем апоптоза или некроза или же сохранение (и даже возрастание) функциональной активности клеток. Реализация того или иного пути зависит, по-видимому, от степени развития в ней окислительного стресса, и следовательно, от исходного состояния клетки.

Таким образом, полученные нами результаты важно учитывать при прогнозировании терапевтических эффектов аутотрансфузии УФ-облученной крови в клинике в ходе лечения заболеваний различной этиологии и степени тяжести.

**Ключевые слова:** гексокиназа, глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа, лимфоциты, УФ-свет.

При лечении ряда заболеваний воспалительного генеза современная медицина использует различные методы светолечения, особенно широкое распространение получил метод АУФОК. Это обусловлено активацией пролиферации клеток, иммуномодулирующим действием излучения,

улучшением микроциркуляции и нормализацией метаболических процессов в клетках крови [1, 2]. Проблема выяснения физико-химических механизмов лечебного эффекта фотомодифицированной крови является актуальной и в настоящее время. Так, например, недостаточно изучено влияние УФ-облучения на энергетический обмен клеток, в частности, лимфоцитов. Именно обеспеченность

или недостаток энергии определяют дальнейшую цепь регуляторных, метаболических и структурных изменений в организме [3, 4].

В экспериментах, проведенных нами ранее, показано, что в УФ-модифицированных лимфоцитах изменяются процессы синтеза АТФ, активируется синтез ряда ферментов и клеточных рецепторов [5-12].

В связи с вышеизложенным возникает необходимость проведения исследований, направленных на изучение молекулярно-клеточных механизмов, лежащих в основе изменений метаболизма лимфоцитов, УФ-облученных в терапевтическом диапазоне доз. В данной статье рассматривается действие УФ-света на функциональные свойства ключевых ферментов метаболизма глюкозы: глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы (Г6ФД) и гексокиназы (ГК). Гликолиз и пентозофосфатный путь (ПФП) тесно связаны: глюкозо-6-фосфат, образующийся в первой реакции гликолиза гексокиназой (один из ключевых ферментов гликолиза), может затем вступать как в реакции окисления до пирувата в процессе гликолиза, так и подвергаться окислению Г6ФД в реакции пентозофосфатного пути.

## МЕТОДИКА ЭКСПЕРИМЕНТА

Объектом исследования явились лимфоциты крови доноров, которые получали путем центрифугирования гепаринизированной крови в градиенте плотности фиколл-урографина. УФ-облучение суспензии клеток (1 мл,  $1 \cdot 10^6$  клеток/мл) через светофильтр УФС-1 (240-390 нм) проводили в термостатируемой ( $20 \pm 1$  °С) кювете светом лампы типа ДРТ-400. Интенсивность излучения – 151 Дж/(м<sup>2</sup>·мин). Облучение суспензии клеток УФ-светом в узком диапазоне длин волн при  $\lambda_{\max} = 254$  нм и  $\lambda_{\max} = 365$  нм проводили с помощью облучателя Bio-Link-BLX (Vilber Lourmat) в дозах 300 и 450 Дж/м<sup>2</sup>. Контроль дозы облучения осуществляли с помощью встроенного дозиметра облучателя.

Лимфоциты инкубировали в течение 24 часов в питательной среде RPMI-1640 в присутствии гентамицина при температуре 37 °С в термостате в среде, насыщенной CO<sub>2</sub> (5 %). К опытным пробам в различных сериях экспериментов добавляли: циклогексимида ( $10^{-3}$  моль/л) и/или аутологичную плазму (18 % от общего объема).

Для определения активности ферментов клетки лизировали путем гипосмотического шока. Активность гексокиназы определяли энзиматическим методом, в качестве сопрягающего фер-

мента добавляли Г6ФД и НАДФ. Об активности Г6ФД судили по скорости восстановления НАДФ – по увеличению оптической плотности при 340 нм, измерения проводили на спектрофотометре Shimadzu UV-2401 PC [13].

Статистическую обработку результатов исследований осуществляли с помощью пакета программ “Excel”. Отличия в контрольных и опытных сериях экспериментов анализировали с помощью метода попарных сравнений, используя t-критерий Стьюдента. Отличия считали достоверными при уровне значимости  $p \leq 0,05$ . Полученные результаты представляли как среднее значение показателя  $\pm$  доверительный интервал.

## ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Нами была исследована активность гексокиназы лимфоцитов в питательной среде с плазмой крови и без нее (рис. 1). Показано, что в ходе суточной инкубации лимфоцитов активность гексокиназы повышается, причем это повышение более выражено в УФ-облученных лимфоцитах.

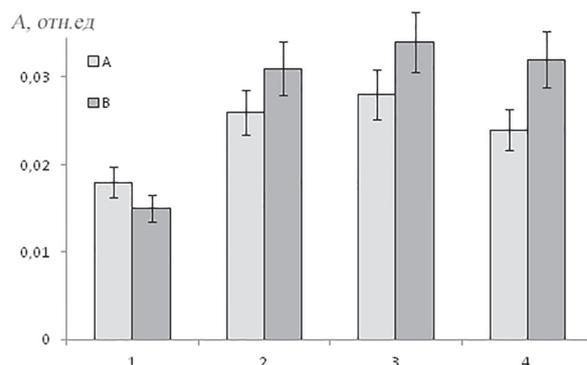


Рис. 1. Влияние УФ-света (240 – 390 нм) на активность гексокиназы в ходе инкубации лимфоцитов. Обозначения: А – нативные клетки, В – облученные клетки (755 Дж/м<sup>2</sup>); 1 – клетки без инкубации, 2 и 3 – клетки, инкубированные в течение 24 часов без плазмы и в присутствии плазмы соответственно, 4 – лимфоциты, инкубированные в присутствии циклогексимида ( $10^{-3}$  моль/л)

Для выяснения возможных механизмов повышения активности Г6ФД мы использовали циклогексимида – блокатор белкового синтеза. Уровень активности гексокиназы в лимфоцитах, инкубированных в отсутствие и в присутствии циклогексимида, статистически значимо не отличается.

Активность Г6ФД лимфоцитов непосредственно после облучения (240 – 390 нм, 755 Дж/м<sup>2</sup>) достоверно не изменяется, в ходе инкубации клеток отмечено повышение активности данного фер-

мента (рис. 2). При инкубации и нативных, и облученных лимфоцитов в присутствии ЦГ активность Г6ФД снижается до одинакового уровня.

В ходе экспериментов с использованием УФ-

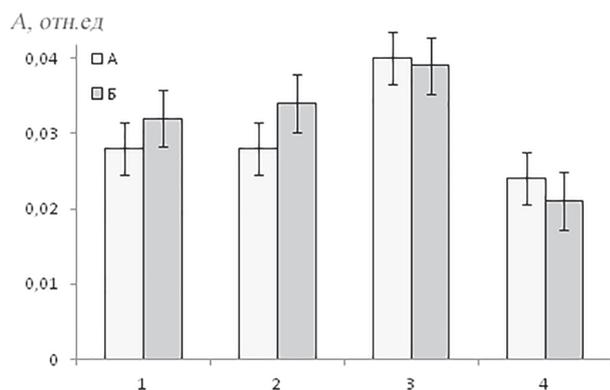


Рис. 2. Влияние УФ-облучения в дозе 755 Дж/м<sup>2</sup> на активность Г6ФД в ходе инкубации лимфоцитов. Обозначения: А – нативные клетки, В – облученные клетки (755 Дж/м<sup>2</sup>); 1 – клетки без инкубации, 2 и 3 – клетки, инкубированные в течение 24 часов без плазмы и в присутствии плазмы соответственно, 4 – лимфоциты, инкубированные в присутствии циклогексимида (10<sup>-3</sup> моль/л)

света узкого диапазона длин волн было показано, что непосредственно после облучения УФ-светом с  $\lambda_{\max} = 254$  нм в дозах 300 и 450 Дж/м<sup>2</sup> активность фермента повышается, но в ходе суточной инкубации в облученных клетках происходит снижение активности Г6ФД (рис. 3). Воздействие УФ-света с  $\lambda_{\max} = 365$  нм в тех же дозах приводит к резкому повышению данного параметра как непосредственно после облучения, так и через сутки после него.

Нами ранее было показано [5], что в облученных клетках, инкубируемых в отсутствие плазмы, наблюдается резкое увеличение активности митохондриальных ферментов: сукцинатдегидрогеназы и цитохром с оксидазы, обусловленное их синтезом *de novo*. Таким образом, в фотомодифицированных лимфоцитах (в сравнении с необлученными), наблюдается преобладание аэробного пути окисления глюкозы. Это согласуется с выявленным нами фактом возрастания активности гексокиназы в лимфоцитах после их УФ-облучения (рис. 1). Использование циклогексимида в ходе инкубации УФ-облученных клеток показало, что данное повышение активности фермента не связано с его синтезом *de novo*.

В то же время в лимфоцитах, инкубированных в присутствии аутологичной плазмы, значения активности лактатдегидрогеназы (ЛДГ), сукци-

натдегидрогеназы (СДГ) и цитохром с оксидазы (ЦО) приближаются к исходному уровню в нативных клетках [11]. Таким образом, использование плазмы крови при инкубации как нативных, так и фотомодифицированных лимфоцитов позволяет снизить интенсивность ПОЛ, сохранить интактность митохондриальной мембраны, что приводит к защите клеток от развития окислительного стресса. В результате активность ферментов дихтомического пути окисления глюкозы достоверно не отличается от показателей, характерных для нативных клеток непосредственно после их выделения. Это позволяет клеткам (в присутствии плазмы) не только сохранить исходный уровень АТФ, но и снизить потребление глюкозы в энергетических целях, тем самым способствуя ее участию в синтетических процессах. Данное предположение подтверждается зарегистрированным нами повышением активности окислительного этапа пентозофосфатного пути (наблюдается активация глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы) (рис. 2 и 3). Г6ФД – ключевой и скорость-лимитирующий фермент пентозофосфатного пути окисления глюкозы. Роль этого фермента в метаболизме клеток очень важна, поскольку в ходе реакций, катализируемых Г6ФД, происходит образование НАДФН, необходимого для поддержания функциональной активности и целостности клетки [14]. Восстановленный НАДФ необходим для роста, дифференцировки и запрограммированной гибели клеток, для нормального функционирования антиоксидантной системы (ее глутатионового звена) [15]. Активация ПФП более выражена при инкубации УФ-облученных лимфоцитов в присутствии аутологичной плазмы крови, следовательно, данный процесс индуцируется как УФ-светом, так и физиологически активными компонентами плазмы крови. Результаты экспериментов с применением циклогексимида указывают на то, что в повышении активности фермента основную роль играет синтез данного белка *de novo*, об этом же свидетельствует и отсутствие активации Г6ФД в облученных эритроцитах.

При исследовании влияния УФ-света разных длин волн на активность Г6ФД выявлено, что у данного фермента непосредственно после облучения лимфоцитов она повышается. Но после суточной инкубации в клетках, облученных при  $\lambda_{\max} = 254$  нм, происходит понижение, а при воздействии облучения с  $\lambda_{\max} = 365$  нм – повышение активности Г6ФД (см. рис. 3). Это означает, что активация Г6ФД при действии интегрального по-

тока УФ-света (240 – 390 нм) обусловлена действием именно длинноволнового УФ-света на лимфоциты.

В нативных клетках после суточной инкуба-

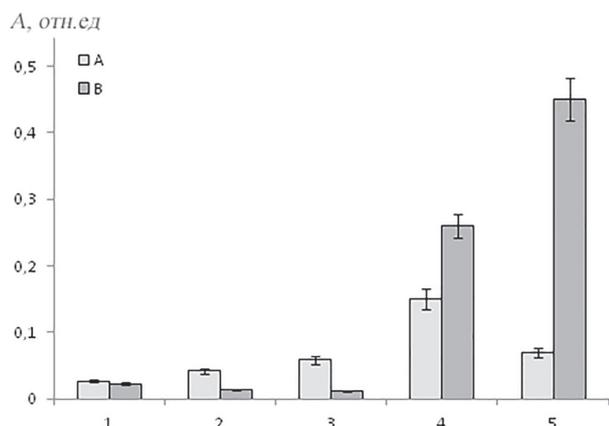


Рис. 3. Изменение активности Г6ФД лимфоцитов под действием УФ-света (254 и 365 нм). Обозначения: А – клетки без инкубации, В – клетки после суточной инкубации; 1 – нативные клетки, 2 и 3 – воздействие УФ-света с  $\lambda=254$  нм, 4 и 5 – с  $\lambda=365$  нм в дозах 300 (2 и 4) и 450 (3 и 5) Дж/м<sup>2</sup> происходит выраженное понижение активности Г6ФД, это должно приводить к уменьшению концентрации НАДФН и, следовательно, к пони-

жению активности антиоксидантной системы (за счет уменьшения количества восстановленного глутатиона).

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Итак, на основании полученных данных и с использованием наших результатов, представленных в ряде статей [5-12], нами предложена схема процессов, протекающих в лимфоцитах в ходе их фотомодификации и последующей инкубации (рис. 4). После УФ-облучения суспензии лимфоцитов возможны три пути ответной реакции клеток на внешнее воздействие: гибель клеток путем апоптоза или некроза или же сохранение (и даже возрастание) функциональной активности иммуноцитов. Реализация того или иного пути зависит, очевидно, от исходного состояния клетки, от степени развития в ней окислительного стресса [16, 17]. Антиоксиданты, содержащиеся в плазме крови, защищают лимфоциты от окислительного стресса, а ростовые факторы предотвращают развитие апоптоза по р53-зависимому пути [18-20].

Таким образом, регистрируемые нами эффекты вносят существенный вклад в модификацию функциональной активности иммунокомпетентных клеток и, соответственно, в реализацию им-

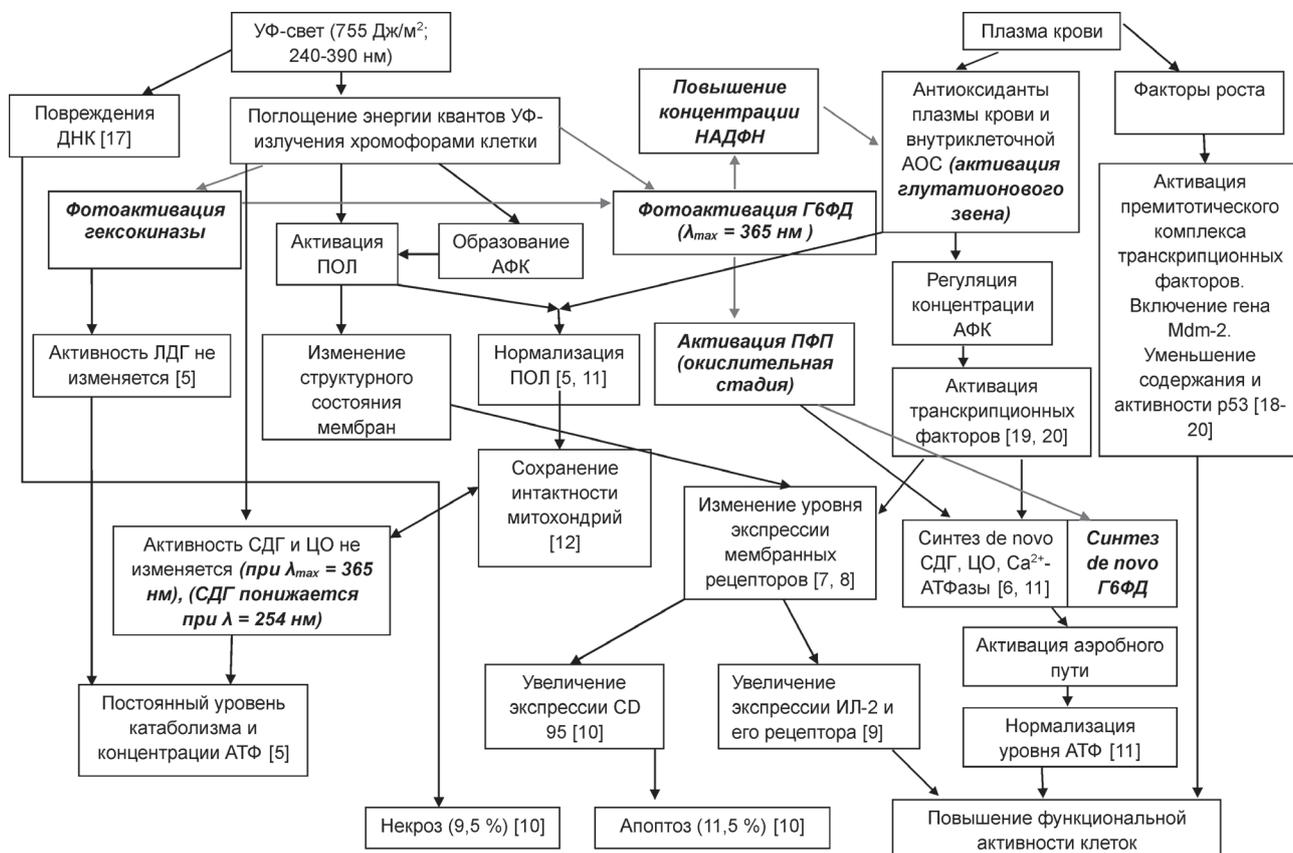


Рис. 4. Схема процессов, протекающих в лимфоцитах в ходе их УФ-облучения

мунного ответа на воздействие УФ-света. Это необходимо учитывать при прогнозировании эффектов АУФОК-терапии в клинике при лечении заболеваний различной этиологии.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Карандашов В.И., Петухов Е.Б., Зродников В.С. Фототерапия / Москва, Медицина, 2001, 392 с.
2. Залеская Г.А. Фотомодификация крови терапевтическими дозами оптического излучения / Москва, РусАльянс Сова, 2015, 212 с.
3. Marelli-Berg F.M., Fu H., Mauro C. // Immunology. 2012. Vol 136 (4). pp. 363-369.
4. Сергеева И.В., Камзалакова Н.И., Тихонова Е.П., Зотина Г.П., Алимов А.Д. // Фундаментальные исследования. 2015. № 1-4. С. 821-824.
5. В.Г. Артюхов, О.В. Земченкова, О.В. Башарина, Я.В. Ким // Радиационная биология. Радиоэкология. 2011. Т. 51. № 2. С. 252-257.
6. Артюхов В.Г., Башарина О.В., Савостина И.Е. // Иммунология. 2011. Т. 30. № 3. С. 152-154.
7. Артюхов В.Г., Башарина О.В., Земченкова О.В., Рязанцев С.В. // Радиационная биология. Радиоэкология. 2016. Т. 56. № 1. С. 73-80.
8. Артюхов В.Г., Земченкова О.В., Башарина О.В., Рязанцев С.В. // Радиационная биология. Радиоэкология. 2012. Т. 52. № 5. С. 534-541.
9. Артюхов В.Г., Земченкова О.В., Башарина О.В., Рязанцев С.В. // Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. 2013. Т.

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

*Артюхов В. Г., доктор биол. наук, профессор,  
зав. кафедрой биофизики и биотехнологии  
Тел.: +7 (473) 220-89-81  
E-mail: artyukhov@bio.vsu.ru*

*Помясова М. Г., магистр кафедры биофизики  
и биотехнологии*

*Воронежский государственный медицинский  
университет имени Н.Н. Бурденко  
Земченкова О. В., кандидат биол. наук, ассистент  
кафедры биохимии*

*Особенности функционирования ключевых ферментов*

11. № 7. С. 48-52.
10. Артюхов В.Г., Земченкова О.В., Башарина О.В., Рязанцев С.В., Пашков М.В. // Цитология. 2014. Т. 56. № 1. С. 77-83.
11. Башарина О.В., Земченкова О.В., Артюхов В.Г. // Радиационная биология. Радиоэкология. 2012. Т. 52. № 6. С. 602-607.
12. Земченкова О.В., Артюхов В.Г., Башарина О.В., Ким Я.В., Наливкина М.А. // Вестник Воронежского государственного университета. Серия: Химия. Биология. Фармация. 2011. № 1. С. 80-84.
13. Beutler E., Kuhl W. // Hum.Genet. 1990. Vol. 85. pp. 9-11.
14. Zimmer H.G. // Mol. Cell. Biochem. 1996. Vol. 160-161(1). pp. 101-109.
15. Cheng M.L. Ho H.-Y., Wu Y.-H., Chiu T.-Y. // Free Radic. Biol. Med. 2004. Vol.36. pp.580-591.
16. Фомченко Н.Е., Воропаев Е.В. // Проблемы здоровья и экологии. 2013. № 1 (35). С. 39-45.
17. Наквасина М.А., Трубицына М.С., Соловьева Е.В., Артюхов В.Г. // Биофизика. 2012. Т. 57. № 4. С. 631-640.
18. Roxburgh P. Manipulating the p53 pathway for cancer treatment // PhD thesis, Glasgow, 2013, 167 p.
19. Poli G., Leonarduzzi G., Biasi F., Chiarotto E. // Current medicinal chemistry. 2004. Vol. 11. pp.1163-1182.
20. Sun Y., Oberley L.W. // Free Radical Biology and Medicine. 1996. Vol. 21. pp.335-348.

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

*Artyukhov V. G., PhD, DSci., Full Professor, Head  
of the Biophysics and Biotechnology department  
Ph.: +7 (473) 220-89-81  
E-mail: artyukhov@bio.vsu.ru*

*Pomyasova M. G., magister of the Biophysics and  
Biotechnology department*

*Voronezh state medical University named after N.  
N. Burdenko  
Zemchenkova O. V., PhD, Assistant Professor,  
department of biochemistry*

## FEATURES OF FUNCTIONING OF KEY ENZYMES OF METABOLIC PATHWAYS IN UV-MODIFIED LYMPHOCYTES FROM THE DONOR BLOOD

O. V. Basharina<sup>1</sup>, O. V. Zemchenkova<sup>2</sup>, V. G. Artyukhov<sup>1</sup>, M. G. Pomyasova<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Voronezh State University

<sup>2</sup>Voronezh state medical University named after N. N. Burdenko

**ABSTRACT.** The ability of lymphocytes to change the activity of enzymes on different stages of metabolism reflects the adaptive capacity of cells and indicates their functional activity. We have shown that under the influence of UV irradiation there are significant changes in the energy metabolism of lymphocytes. It was found that during the daily incubation of lymphocytes, the activity of the key enzyme glycolysis – hexokinase – increases, and this increase is more pronounced in UV-irradiated (240 – 390 nm) lymphocytes; this increase in enzyme activity is not associated with its de novo synthesis. In photomodification lymphocytes is also detected activation of one of key enzymes pentozofosfatnogo road – glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD). The increase in the activity of G6PD under the action of the integral flow of UV light is due to the action of long-wave UV light ( $\lambda_{\max} = 365$  nm) on lymphocytes; in this process, the main role is played by the synthesis of the enzyme de novo.

In photomodified lymphocytes compared with unirradiated is observed predominance of aerobic pathway of glucose oxidation. This process is consistent with the effect of increase of hexokinase activity in lymphocytes after UV irradiation which we have identified to. The ability of cells to change activity of enzymes dichotomous and pentose phosphate pathways of glucose oxidation reflects the adaptive capabilities of cells and indicates the presence of complex mechanisms of regulation of their functional activity. We have developed a scheme of processes occurring in lymphocytes during their photomodification and subsequent incubation on the based of experiments and our earlier results presented in a number of articles, as well as taking into account the literature data.

After UV-irradiation of lymphocyte suspension, different ways of cell response to external effects are possible: death of lymphocytes by apoptosis or necrosis or preservation (and even increase) of functional activity of cells. The realization of this or that pathway depends, apparently, on the degree of oxidative stress development in it, and therefore, on the initial state of the cell.

Thus, the results obtained by us are important to take into account when predicting the therapeutic effects of autotransfusion of UV-irradiated blood in the clinic during the treatment of diseases of different etiology and severity.

**Keywords:** hexokinase, glucose-6-phosphate dehydrogenase, lymphocytes, UV light.

### REFERENCES

1. Karandashov V.I., Petuhov E.B., Zrodnikov V.S. Fototerapiya. Moscow, Medicina, 2001, 392 p.
2. Zaleskaya G.A. Fotomodifikatsiya krovi terapevticheskimi dozami opticheskogo izlucheniya. Moscow, RusAl'yans Sova, 2015, 212 p.
3. Marelli-Berg F.M., Fu H., Mauro S., Immunology, 2012, № 136 (4), pp. 363-369.
4. Sergeeva I.V., Kamzalakova N.I., Tihonova E.P., Zotina G.P., Alimov A.D., Fundamental study, 2015, No. 1-4, pp. 821-824.
5. V.G. Artyukhov, O.V. Zemchenkova, O.V. Basharina, Y.V. Kim, Radiation biology. Radioecology, 2011, Vol. 51, No. 2, pp. 252-257.
6. Artyukhov V.G., Basharina O.V., Savostina I.E., Immunology, 2011, Vol. 30, No. 3, pp. 152-154.
7. Artyukhov V.G., Basharina O.V., Zemchenkova O.V., Ryazantsev S.V., Radiation biology. Radioecology, 2016, Vol. 56, No. 1, pp. 73-80.
8. Artyukhov V.G., Zemchenkova O.V., Basharina O.V., Ryazantsev S.V., Radiation biology. Radioecology, 2012, Vol. 52, No. 5, pp. 534-541.
9. Artyukhov V.G., Zemchenkova O.V., Basharina O.V., Ryazantsev S.V., Issues of biological, medical and pharmaceutical chemistry, 2013, Vol. 11, No. 7, pp. 48-52.
10. Artyukhov V.G., Zemchenkova O.V., Basharina O.V., Ryazantsev S.V., Pashkov M.V., Cytology, 2014, Vol. 56, No. 1, pp. 77-83/
11. Basharina O.V., Zemchenkova O.V., Artyukhov V.G., Radiation biology. Radioecology, 2012, Vol. 52, No. 6, pp. 602-607.
12. Zemchenkova O.V., Artyukhov V.G., Basharina O.V., Kim Y.V., Nalivkina M.A., Bulletin

of Voronezh state University. Ser. Chemistry. Biology. Pharmacy, 2011, No. 1, pp. 80-84.

13. Beutler E., Kuhl W., Hum.Genet., 1990, Vol. 85, pp. 9-11.

14. Zimmer H.G., Mol. Cell. Biochem., 1996, Vol. 160-161(1), pp. 101-109.

15. Cheng M.L. Ho H.-Y., Wu Y.-H., Chiu T.-Y., Free Radic. Biol. Med., 2004, Vol.36, pp.580-591.

16. Fomchenko N.E., Voropaev E.V., Health and environmental problems, 2013, No. 1 (35), pp. 39-45.

17. Nakvacina M.A., Trubitsyna M.S., Solov'eva E.V., Artyukhov V.G., Biophysics, 2012, Vol. 57, No. 4, pp. 631-640.

18. Roxburgh P. Manipulating the p53 pathway for cancer treatment. PhD thesis, Glasgow, 2013, 167 p.

19. Poli G., Leonarduzzi G., Biasi F., Chiarotto E., Current medicinal chemistry, 2004, Vol. 11, pp.1163–1182.

20. Sun Y., Oberley L.W., Free Radic. Biol. Med., 1996, Vol. 21, pp.335–348.