

**ИЗМЕНЕНИЕ ЭНЕРГЕТИЧЕСКОГО МЕТАБОЛИЗМА ТИМОЦИТОВ  
КРЫС РАЗНЫХ ВОЗРАСТНЫХ ГРУПП ПРИ ДЕЙСТВИИ  
ПЕРОКСИНИТРИТА**

**Никитина И.А.,**

*к. б. н., заведующая кафедрой биологической химии учреждения  
образования «Гомельский государственный медицинский университет», г.  
Гомель, Беларусь  
nikkitina@gmail.com;*

**Грицук А.И.**

*д. м. н., профессор, заведующий кафедрой фармакологии и технологии  
лекарств Одесского национального университета имени И.И. Мечникова, г.  
Одесса, Украина;*

*Для выяснения роли возрастных особенностей ответной реакции клеток  
иммунной системы на действие провоспалительного (окисляющего) агента,  
изучено влияние пероксинитрита (30 мкМ) на процессы тканевого дыхания  
timoцитов у крыс 3- и 8-месячного возраста. С помощью полярографического  
метода было установлено, что воздействие экстремального стресс-  
вызывающего фактора – окисляющего агента пероксинитрита – вызывает  
различный отклик в системах утилизации кислорода в тимоцитах крыс разного  
возраста.*

*Ключевые слова: тимоциты; возраст; пероксинитрит; цитоскелет;  
воспаление*

**AGE RELATED ALTERATION OF ENERGY METABOLISM IN  
THYMOCYTES OF RATS UNDER EXPOSURE TO PEROXYNITRITE**

**Nikitina I.A.,**

*Candidate of Biological Sciences, Head of the Department of Biological  
Chemistry of the Educational Institution "Gomel State Medical University", Gomel,  
Belarus*

*nikkitina@gmail.com;*

**Gritsuk A.I.**

*Doctor of Medical Sciences, Professor, Head of the Department of  
Pharmacology and Drug Technology of the Odessa I.I. Mechnikov National  
University, Odessa, Ukraine;*

*Influence of peroxyntirite (30 μM) on tissue respiration in thymocytes of 3- and  
8-month rats was studied with aim to reveal importance of ageing processes in changes  
of immune system cells response to proinflammatory (oxidizing) agent. Polarography  
method allows us to establish that extreme stress factor – oxidizing agent peroxyntirite  
– induce discrepant response in the oxygen utilization systems of rats with different  
age.*

*Key words: thymocyte, age, peroxyntirite, cytoskeleton, inflammation*

Гипотеза D.C. Wallace о том, что эффективная функциональная активность тканей возможна лишь при адекватном их энергообеспечении подтверждается многими авторами [2, 7, 11, 12, 15, 17], а также работами, согласно которым возрастная иммуносупрессия и нарушение клеточного звена иммунитета при воздействии стрессовых факторов сопровождается существенным снижением активности митохондриального окисления тимуса и других иммунокомпетентных органов [9, 10, 11, 13].

Митохондрии являются не только основным поставщиком АТФ в клетке, но и главным продуцентом активных форм кислорода (АФК) и их разновидностей – активных форм азота (АФА) [1, 8], вызывающих повреждение митохондриальной ДНК, нарушение дыхательной активности ткани и другие негативные последствия. Пероксинитрит, взаимодействует с диоксидом углерода, концентрация которого в матриксе довольно высока, образуя радикалы  $\text{CO}_3^{\cdot-}$  и  $\text{NO}_2$ , принимающие активное участие в развитии митохондриальной дисфункции, проявлением которой является деэнергизация клетки, нарушение гомеостаза ионов кальция, открытие пор повышенной проводимости и инициация апоптоза [13, 14, 15].

Очевидным проявлением старения является развитие иммунодепрессии, ведущую роль, в формировании которой играют возрастные нарушения в сфере энергетического гомеостаза организма [3]. Проблема возрастных изменений в системе митохондриального окисления иммунокомпетентных клеток остается малоизученной [11, 17], несмотря на ее исключительный научно-практический интерес, обусловленный перспективой разработки и использования эффективных средств иммунокоррекции.

**Цель работы:** проанализировать особенности ответной реакции системы тканевого дыхания тимоцитов крыс разного возраста (3 и 8 месяцев) на действие пероксинитрита.

**Материалы и методы.** Все экспериментальные работы с лабораторными животными выполнялись в соответствии с общепринятыми нормами обращения с животными и правилами Директивы 2010/63/EU Европейского Парламента и Совета Европейского Союза по охране животных, используемых в научных целях от 22 сентября 2010 года.

Исследования проводили на белых беспородных крысах двух возрастных групп: 3 месяца и 8 месяцев. Суспензии клеток обрабатывали пероксинитритом в концентрации 30 мкМ в течение 3 минут с последующей отмывкой. Пероксинитрит получали в реакции  $\text{NaNO}_2$  и  $\text{H}_2\text{O}_2$  в кислых водных растворах с последующим быстрым их защелачиванием [16].

В клеточных препаратах изучали показатели тканевого дыхания (ТД) и окислительного фосфорилирования (ОФ) на установке Record 4 (ИТЭБ РАН, Пущино, Россия) в ячейке объемом 1 мл с закрытым платиновым электродом Кларка при температуре 27°C в растворе Хэнкса [4]. Образцы суспензии клеток тимуса каждого животного исследовали в трехкратной повторности. Скорость

поглощения кислорода тканевыми препаратами выражали в нмоль  $O_2$  за 1 мин  $\times 10^7$  клеток. Определение количества клеток производили стандартным методом подсчета в камере Горяева. Так как многие используемые в эксперименте субстраты не могут свободно проникать сквозь клеточную мембрану [17], в эксперименте использовали тимоциты, предварительно пермеабиллизированные дигитонином (2 мМ). Состояние энергетического обмена исследуемой ткани определяли по скорости потребления кислорода тимоцитами на эндогенных субстратах ( $V_{энд}$ ), а также с использованием субстратов дыхания: сукцинат, 5 мМ ( $V_{як}$ ) и глутамат 5 мМ ( $V_{глу}$ ). Также оценивали параметры митохондриального дыхания при ингибировании первого комплекса дыхательной цепи амиталом (5 мМ). Для оценки дыхательного контроля добавляли АДФ в концентрации 50 мМ. Вклад митохондриального дыхания в общее потребление кислорода клеткой определялся путем титрования азидом натрия ингибирующего дыхательную цепь митохондрий на уровне цитохромоксидазы. Азид натрия вносился титрометрически 4-5 порциями, непосредственно в полярографическую ячейку, до максимального падения уровня потребления кислорода [5]. «Остаточный», резистентный к азиду, кислород составляет немитохондриальный поток клеточного кислорода (не используемый для работы дыхательной цепи митохондрии). Разница между общим потреблением кислорода на эндогенных субстратах и кислородом, потребление которого сохраняется после ингибирования азидом натрия, является вкладом митохондриальной электрон-транспортной цепи в утилизацию кислорода.

Данные представлены с использованием медианы и границ верхнего и нижнего квартилей. Оценку достоверности различий между средними выборочными значениями проводили с помощью критерия Манна–Уитни (для независимых переменных). Различия между средними выборочными значениями признавали достоверным при  $p < 0,05$ .

**Полученные результаты.** Средняя скорость эндогенного дыхания тимоцитов у 3-месячных крыс составила 5,8; 5,0–7,1 нмоль  $O_2$ /мин  $\times 10^7$  клеток и практически не отличалась от соответствующего показателя у 8-месячных животных 5,7; 4,6–6,7 нмоль  $O_2$ /мин  $\times 10^7$  клеток. При этом величины верхнего и нижнего квартилей указывают на наличие тенденции к снижению с возрастом скорости митохондриального дыхания иммунокомпетентных клеток. Этот факт согласуется с известными данными литературы [17].

При добавлении к суспензии клеток глутамата натрия – восстанавливающего первый комплекс электротранспортной цепи, дыхательная активность тимоцитов 3-месячных животных возрастает более чем на 35%, тогда как в тимоцитах 8-месячных животных изменения незначительны. Полученные данные косвенно указывают на возрастную разницу в активности глутаматдегидрогеназы в условии избыточного количества субстрата в клетках тимуса. В то же время, ранние исследования Cittadini и др. [6] показали отсутствие стимулирующего действия глутамата на тканевое дыхание

тимоцитов крысы, которое, по нашему мнению, связано с использованием непермеабилizованных клеток, обладающих, как известно, более медленным мембранным транспортом глутамата. Добавление в среду инкубации АДФ изменяет соотношение АТФ/АДФ, но не вызывает значимого увеличения уровня дыхательной активности в тимоцитах как 3-х, так и 8-месячных животных. Ответ системы ТД и ОФ в тимоцитах на введение АДФ менее выражен, чем ответ на действие солей глутаминовой кислоты. При этом сохраняются достоверные различия в уровне митохондриального дыхания тимоцитов 3- и 8-месячных животных после последовательного введения АДФ.

Ингибиторный анализ с использованием амитала позволил количественно оценить функциональную активность первого комплекса дыхательной цепи. В присутствии амитала уровень митохондриального дыхания уменьшается на 49% и 43% соответственно для 3-х и 8-месячных крыс, что отражает несколько более высокий вклад первого комплекса в систему митохондриального дыхания тимоцитов молодых животных.

Введение сукцината на фоне ингибирования первого комплекса дыхательной цепи дает возможность косвенно оценить обеспеченность эндогенными субстратами, а также активность сукцинатдегидрогеназы (СДГ) и второго дыхательного комплекса. Полученный результат указывает на относительно высокую активность СДГ в тимоцитах животных старшей возрастной группы. Таким образом, субстратный и ингибиторный анализ митохондриального окисления косвенно указывают на относительно большую активность первого комплекса в тимоцитах 3-месячных животных и второго дыхательного комплекса – в тимоцитах 8-месячных.

Пероксинитрит уменьшает уровень эндогенного дыхания в тимоцитах 3-месячных животных почти на 17%. При этом, несмотря на уменьшение скорости потребления кислорода, система тканевого дыхания тимоцитов 3-месячных животных сохраняет «запас прочности» и способность увеличивать уровень дыхания в ответ на добавление глутамата и АДФ. Так, введение экзогенного глутамата повышает потребление кислорода тимоцитами 3-месячных животных на 40%, а изменение отношения АТФ/АДФ приводит к росту интенсивности тканевого дыхания еще на 5%.

Интенсивность тканевого дыхания тимоцитов 8-месячных животных в ответ на действие пероксинитрита практически не изменяется и составляет 5,9; 5,0–6,4 нмоль  $O_2$ /мин на  $10^7$  клеток. Необходимо отметить, что рост потребления кислорода тимоцитами данной группы животных в ответ на введение экзогенного глутамата соизмерим с таковым в одновозрастном контроле и остается в 5 раз ниже по сравнению с аналогичными показателями у 3-месячных животных. Воздействие пероксинитрита приводит к тому, что стимулирование дыхательной активности АДФ на фоне избыточного содержания субстратов первого комплекса у 8-месячных животных на 8% ниже, чем у контрольных животных. В тимоцитах 3-месячных крыс после обработки пероксинитритом воздействие амитала приводит к уменьшению уровня тканевого дыхания на 45%,

а у 8-месячных – на 61%. Воздействие пероксинитрита приводит к возрастанию роли сукцината в обеспечении работы дыхательной цепи, что выражается в увеличении дыхательной активности клеток при его введении в среду. У 8-месячных животных этот показатель возрастает на 25% (в 2,5 раз выше, чем в одновозрастном контроле), а у 3-х месячных на 28% (более чем в четыре раза выше в сравнении с контрольными значениями той же возрастной группы).

Полученные данные свидетельствуют об отсутствии возрастных изменений общего уровня энергетического метаболизма тимоцитов крыс. В то же время, после увеличения нагрузки на электрон-транспортную систему, путем введения АДФ и субстратов первого и второго дыхательных комплексов, появляется разница в ответной реакции.

**Заключение.** Скорость митохондриального дыхания интактных тимоцитов 3- и 8-месячных животных не имеет значимых различий. Методами субстратного и ингибиторного анализа выявлено возрастное снижение вклада в дыхательную активность тимоцитов первого комплекса дыхательной цепи митохондрий и увеличение – второго. Обработка изолированных тимоцитов 3- и 8-месячных животных 30 мкМ ONOO<sup>-</sup>, инициирующего провоспалительный эффект, стимулирует в них активность II комплекса дыхательной цепи.

### Список литературы

1. Андреев, А.Ю., Метаболизм активных форм кислорода в митохондриях / А.Ю. Андреев, Ю.Е. Кушнарера, А.А. Старков // Биохимия. – 2005. – Т. 70, №2. – С. 246–264.
2. Грицук, А.И. Влияние инкорпорированных радионуклидов цезия на ультраструктуру и процессы тканевого дыхания митохондрий кардиомиоцитов / А. И. Грицук [и др.] // Вес. Нац. акад. наук Беларуси Сер. мед.-биол. Наук. – 2002. – № 2. – С 63–70.
3. Дильман, В.М. Большие биологические часы / В. М. Дильман. – Изд. 2-е, перераб. и доп. – М. : Знание, 1986. – 256 с.
4. Кондрашова М.Н., Ананенко А. А. Руководство по изучению биологического окисления полярографическим методом. – М., 1973. – 119 с.
5. Brown, G.C. Control of respiration and ATP synthesis in mammalian mitochondria and cells / G. C. Brown // The Biochem. J. – 1992. – Vol. 284, pt. 1. – P. 1–13.
6. Cittadini, A. Energy metabolism of isolated rat thymus cells / A. Cittadini [et al.] // Molecular and Cellular Biochemistry. – 1975. – Vol. 8, № 1. – P. 49–57.
7. Dröge, W. Free Radicals in the Physiological Control of Cell Function / W. Dröge // Physiol. Rev. – 2002. – Vol. 82, № 1. – P. 47-95.
8. Elfering, S.L. Biochemistry of mitochondrial nitric-oxide synthase / S.L. Elfering, T.M Sarkela, C.J. Giulivi // Biol Chem. – 2002. – Vol. 277(41), № 11. – P. 38079–38086.
9. Gnaiger, E. Mitochondrial Pathways and Respiratory Control / E Gnaiger. – 1st edition. – Innsbruck: OROBOROS INSTRUMENTS GmbH, 2007. – P. 98.

10. Gagnon, Ch. Peroxynitrite production by human neutrophils, monocytes and lymphocytes challenged with lipopolysaccharide / Ch. Gagnon, A.L. Francois, G.F. Jaènos // FEBS Letters. – 1998. – Vol. 431. – P. 107-110.
11. Mather, M. Aging enhances the activation of the permeability transition pore in mitochondria /M. Mather, H.Rottenberg // Biochem Biophys Res Commun. – 2000. – Vol.273(2), №5. – P. 603-608.
12. Pon, L.A. Mitochondria / L.A. Pon, E.A. Schon // Methods in Cell Biology. –2007. – Vol. 80. – P. 451–464.
13. Radi, R. Peroxynitrite reactions and formation in mitochondria / R. Radi [et al.] // Free Radical Biology & Medicine. – 2002. –Vol. 33, №11. – P. 1451–1464.
14. Radi, R. Nitric oxide and peroxynitrite interactions with mitochondria. / R. Radi, A. Cassina, R. Hodara // J. Biol. Chem. – 2002. –Vol. 383. – P. 401–409.
15. Radi, R. Peroxynitrite reactions and formation in mitochondria / R. Radi [et al.] // Free Radical Biology & Medicine. – 2002. – Vol. 33, №11. –P. 1451–1464.
16. Robinson, K.M. Synthesis of Peroxynitrite from Nitrite and Hydrogen Peroxide / K.M. Robinson, J.S. Beckman // Methods in Enzymology. – 2005. – Vol. 396. – P. 207–214.
17. Rottenberg, H. Mitochondrial dysfunction in lymphocytes from old mice: enhanced activation of the permeability transition. / H. Rottenberg, S. Wu. // Biochem Biophys Res Commun. – 1997. –Vol. 240 (1), № 7. – P. 68-74.