

ВЛИЯНИЕ СУКЦИНАТА НА ЭНЕРГЕТИЧЕСКИЙ МЕТАБОЛИЗМ ТИМУСА КРЫС РАЗНОГО ВОЗРАСТА

Никитина И.А.,

кандидат биологических наук, доцент, заведующая кафедрой биологической химии учреждения образования «Гомельский государственный медицинский университет», г. Гомель, Беларусь
nikkitina@gmail.com;

Аннотация. Для выяснения роли сукцината в энергетическом метаболизме клеток иммунной системы было изучено его влияние на функционирование электрон-транспортной цепи в тканях тимуса и тимоцитах животных разных возрастных групп. С помощью полярографического метода было установлено, что стимулирующий эффект сукцината на систему тканевого дыхания выше в тимоцитах более старых крыс. Значимые изменения скорости потребления кислорода в тканях тимуса 4-, 5- и 6-месячных животных сукцинат не вызывает.

Ключевые слова: тимус; тимоциты; возраст; сукцинат; тканевое дыхание, кислород

INFLUENCE OF SUCCINATE ON THE ENERGY METABOLISM OF THE THYMUS IN RATS OF DIFFERENT AGES

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;

Annotation. Effects of succinate on the electron-transport chain in thymus tissues and thymocytes of animals of different age groups was studied for revealing the role of this metabolite in the energy metabolism of the immune system cells. Using the polarographic method, it was found that the stimulating effect of succinate on the oxygen consumption is higher in thymocytes of older rats. Succinate does not cause significant changes in the rate of oxygen consumption in the thymus tissues of 4-, 5-, and 6-month-old animals.

Keywords: thymus; thymocytes; age; succinate; tissue respiration; oxygen

Сукцинат является одним из важнейших клеточных метаболитов, синтез и утилизируется которого происходит в основном в матриксе митохондрий.

Наряду с окислением этой молекулы в электрон-транспортной дыхательной цепи, сукцинат может выполнять множество других, в первую очередь регуляторных функций за пределами митохондрии [1]. Наличие эффективного механизма транспорта сукцината через внутреннюю мембрану митохондрий позволяет не только уравнивать цитозольный и митохондриальный пул этого метаболита, но и дает ему возможность оказывать регуляторное действие на цитозольные ферменты [1,2].

Также надо отметить, что в условиях гипоксии и интенсивной физической нагрузки активируется рН-зависимая секреция сукцината через цитоплазматическую мембрану. Связавшись с рецептор SUCNR1, действующим через G-белок, внеклеточный сукцинат активирует широкий спектр тканеспецифических реакций в различных клетках [1], в том числе и иммунных [3].

В зависимости от тканевой локализации, сукцинат может участвовать в формировании эпигенома, поддерживать термогенез, влиять на работу ренин-ангиотензиновой системы, стимулировать остеокластогенез и кроветворение [3]. Сукцинат может проявлять провоспалительное действие, в том числе посредством активации в митохондриях синтеза АФК. Так, в условиях низкой клеточной потребности в АТФ, этот метаболит усиливает выработку первым комплексом дыхательной цепи митохондриального супероксида. Дисмутация супероксида марганцевой супероксиддисмутазой (MnSOD) приводит к образованию перекиси водорода, действующей как сигнальная молекула посредством обратимой ковалентной модификации белковых остатков цистеина. Так, например, в адипоцитах бурой жировой ткани стимулированное сукцинатом производство супероксида и перекиси водорода определяет интенсивность процессов термогенеза [1]. Вместе с тем сукцинат может проявлять и противоположное противовоспалительное действие. Например, снижать экспрессию маркеров воспаления в жировой ткани у худых людей, но не у людей с ожирением [4].

Сукцинат, как и другие промежуточные метаболиты ЦТК, активно поддерживает иммунные функции организма, в том числе и посредством передачи различных сигналов. Нарушения в этих сигнальных путях могут вызвать функциональные изменения в иммунных клетках [3,4]. Так, сукцинат активирует врожденную иммунную память, увеличивает активность Т-клеток [4], а в активированных макрофагах накапливающийся на фоне активации гликолитического пути синтеза АТФ сукцинат способствует выработке интерлейкина-1 бета [2,4].

Наряду с многообразием регуляторных функций, сукцинат занимает центральное место в аэробном энергетическом метаболизме клеток. Являясь

прямым связующим метаболитом между циклом Кребса и дыхательной цепью митохондрий сукцинат тесно связан с производством энергии [2]. На сегодняшний день существует ряд экспериментальных данных, полученных на лабораторных животных, подтверждающих увеличение активности митохондриального дыхания в ответ на действие сукцината, особенно в условиях сепсиса и экспериментального сахарного диабета [5], что еще раз указывает на важность сукцината в работе дыхательной цепи митохондрий особенно при гипоксии [6] и на возможность использования метаболитов ЦТК, в том числе и сукцината, в разработке новых подходов к лечению ряда заболеваний иммунной системы, в том числе и связанных с развитием иммунодепрессии, ведущую роль, в формировании которой играют возрастные нарушения в сфере энергетического гомеостаза организма. Проблема возрастных изменений в системе митохондриального окисления иммунокомпетентных клеток остается малоизученной, несмотря на ее исключительный научно-практический интерес.

Целью работы явилось проанализировать роль сукцината в энергетических процессах тканей тимуса и тимоцитах крыс разного возраста.

Материалы и методы. Исследования проводили на белых беспородных крысах 3-,4-,5-,6-, и 8-месячного возраста. 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.

Показатели тканевого дыхания оценивали с помощью установки Record 4 (ИТЭБ РАН, Пущино, Россия) с ячейкой объемом 2 см³ (для ткани тимуса) и 1 см³ (для тимоцитов) с закрытым платиновым электродом Кларка при температуре 27°C в растворе Хэнкса [7]. Количество измерений (n) составляло 1—3 на каждое животное. Скорость поглощения кислорода тканевыми препаратами выражали в нмоль O₂ за 1 мин × 10⁷ клеток или нмоль O₂/мин на 1 мг белка. Количество клеток определяли в камере Горяева, количество белка – биуретовым методом. Тимоциты, предварительно подвергали химической (2 мМ дигитонина), а ткани тимуса механической пермеабилзации, для улучшения транспорта сукцината через клеточные мембраны [8]. Состояние энергетического обмена определяли по скорости потребления кислорода на эндогенных субстратах (V_{энд}), а также с использованием сукцината, 5 мМ (V_{як}). Для ингибирования первого комплекса дыхательной цепи использовали амитал (5 мМ), а для оценки дыхательного контроля добавляли АДФ (50 мМ). Оценку количества кислорода, используемого непосредственно дыхательной цепью митохондрий в общем кислородном пуле тимоцитов, проводили путем ингибирования цитохромоксидазы азидом натрия. Ингибитор титрометрически

добавляли в полярографическую ячейку, до максимального падения уровня потребления кислорода. Разница между общим потреблением кислорода и тем, который используется тимоцитами после введения азида натрия, является искомой величиной митохондриального потребления.

Данные в работе представлены в виде медианы и границ верхнего и нижнего квартилей. Оценку достоверности различий между средними выборочными значениями проводили с помощью критерия Манна–Уитни (для независимых переменных) и критерия Вилкоксона (для зависимых переменных). Выявления статистически значимого различия в выборочных характеристиках параметров дыхания в тканях тимуса животных 4-, 5- и 6-месячного возраста проводили с помощью теста ANOVA Краскела-Уоллиса. Различия между средними выборочными значениями признавали достоверным при $p < 0,05$.

Результаты. Результаты исследований (таблица 1) показывают, что ткани тимуса интактных половозрелых крыс 4-, 5-, и 6-месячного возраста характеризуются относительно высокой скоростью поглощения кислорода на эндогенных субстратах. Данные показатели сравнимы с уровнем поглощения кислорода клетками печени, составляющим в аналогичных условиях 6,66 (5,54-7,61) нмоль O_2 /мин на 1 мг белка [9]. Высокий уровень поглощения кислорода указывает на наличие достаточного количества эндогенных субстратов в тканях тимуса и на высокую активность комплексов электрон-транспортной цепи. Это позволяет обеспечить высокий уровень энергопродукции в тимусе, необходимый для активно протекающих здесь процессов пролиферации, роста, дифференцировки и созревания тимоцитов. Надо отметить, что несмотря на возрастные структурно-функциональные изменения в тимусе у животных 4-, 5-, и 6-месячного возраста не выявлено изменений (тест Kruskal-Wallis ANOVA; $p > 0,05$) в удельном уровне потребления кислорода (таблица 1).

Таблица 1. Скорость поглощения кислорода ($V_{энд}$) клетками тимуса крыс разного возраста на эндогенных субстратах

Возраст животных, мес.	$V_{энд}$	$V_{як}$
4	6,5 (5,68-8,20)	7,4 (6,86-7,95)
5	6,6 (5,21-8,02)	7,6 (7,44-7,85)
6	6,7 (5,52-7,86)	7,75 (7,62-8,00)

Примечание – количество животных во всех возрастных группах равно 6; $m = 3$ для $V_{энд}$ и 1 для $V_{як}$.

Добавление сукцината к механически пермеабелизованным тканям тимуса животных всех возрастных групп не приводит к значимому (критерий Манна-Уитни; $p > 0,05$) росту уровня потребления кислорода (таблица 1).

Для более детального анализа энергетического метаболизма тимуса мы исследовали воздействие сукцината на уровень потребления кислорода дыхательной цепью митохондрий непосредственно тимоцитов животных двух возрастных групп: ювенильные (3 месяца) и молодые (8 месяцев).

Средняя скорость тканевого дыхания тимоцитов на эндогенных субстратах у 3-месячных крыс составила 3,6; 3,33–4,84 нмоль O_2 /мин $\times 10^7$ клеток и практически не отличалась от соответствующего показателя у 8-месячных животных (3,3; 2,89–4,18 нмоль O_2 /мин $\times 10^7$ клеток).

Стимуляция скорости тканевого дыхания добавлением АДФ привела к значимому росту ($p < 0,05$; критерий Вилкоксона) соответствующего показателя у 3-месячных крыс более чем в два раза (7,9; 7,84–8,48 нмоль O_2 /мин $\times 10^7$ клеток). Увеличение ($p < 0,05$; критерий Вилкоксона) соответствующего показателя у 8-месячных крыс несколько ниже (4,8; 4,62–5,01 нмоль O_2 /мин $\times 10^7$ клеток) и составляет примерно 45%. Такая стимуляция не только увеличивает скорость потребления кислорода, но и выявляет возрастные различия в метаболизме тимоцитов. Для более детальной оценки роли второго комплекса дыхательной цепи митохондрий, субстратом которого является сукцинат, проводилось ингибирование первого комплекса амиталом натрия. После этого воздействия уровень дыхания тимоцитов 3-месячных крыс снизился до 2,9 (1,45 - 5,22) нмоль O_2 /мин $\times 10^7$ клеток, а у 8-месячных – 2,3 (1,81 - 2,48) нмоль O_2 /мин $\times 10^7$ клеток. Добавление сукцината вызывает значимое ($p < 0,05$; критерий Вилкоксона) увеличение скорости потребления кислорода в тимоцитах 8-месячных животных (2,8 (2,23 - 3,23) нмоль O_2 /мин $\times 10^7$ клеток) и практически не повлияло ($p > 0,05$; критерий Вилкоксона) на аналогичный показатель в тимоцитах 3-месячных животных (3,2 (3,11 - 3,65) нмоль O_2 /мин $\times 10^7$ клеток). Это позволяет предположить более высокую активность второго комплекса дыхательной цепи, субстратом которого является сукцинат, у животных более старой возрастной группы.

Заключение. Сукцинат играет важную роль в энергетическом метаболизме тимоцитов стареющих крыс, что проявляется в его стимулирующем действии на аэробное дыхание этих клеток. При этом сукцинат практически не влияет на аэробное дыхание тимоцитов более молодых животных. Вместе с этим сукцинат не вызывает значимые изменения скорости потребления кислорода в тканях тимуса 4-, 5- и 6-месячных крыс.

Список литературы

1. Murphy M.P. Why succinate? Physiological regulation by a mitochondrial coenzyme Q sentinel / M.P. Murphy, E.T. Chouchani // Nature Chemical Biology. – 2022. – Т. 18. – Why succinate? – № 5. – С. 461-469.
2. Murphy M.P. Krebs Cycle Reimagined: The Emerging Roles of Succinate and Itaconate as Signal Transducers / M.P. Murphy, L.A.J. O'Neill // Cell. – 2018. – Vol. 174. – Krebs Cycle Reimagined. – № 4. – P. 780-784.

3. Zaslona Z. Cytokine-like Roles for Metabolites in Immunity / Z. Zaslona, L.A.J. O'Neill // *Molecular Cell*. – 2020. – Т. 78. – № 5. – С. 814-823.
4. Coupling Krebs cycle metabolites to signalling in immunity and cancer / D.G. Ryan [и др.] // *Nature Metabolism*. – 2019. – Т. 1. – С. 16-33.
5. Орлов Ю.П. Роль сукцинатов при критических состояниях / Ю.П. Орлов, Н.В. Говорова // *Общая реаниматология* – 2014. Т. 10; № 6. – С. 65-78.
6. Effects of Excess Succinate and Retrograde Control of Metabolite Accumulation in Yeast Tricarboxylic Cycle Mutants / A.-P. Lin [и др.] // *The Journal of Biological Chemistry*. – 2011. – Т. 286. – № 39. – С. 33737-33746.
7. Кондрашова М.Н., Ананенко А. А. Руководство по изучению биологического окисления полярографическим методом. – М., 1973. – 119 с.
8. 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
9. Тканевое дыхание миокарда, печени и тимуса белых крыс после внешнего облучения в дозе 1 Гр / С. М. Сергеенко [и др.] // *Российская научная конференция с межд. участием «Актуальные проблемы токсикологии и радиобиологии» : тез. докл., Санкт-Петербург, 19–20 мая 2011 г. / Воен.-мед. акад. им. С. М. Кирова [и др.]. – СПб., 2011. – С. 141.*