ДОПОВІДІ
НАЦІОНАЛЬНОЇ
АКАДЕМІЇ НАУК
УКРАЇНИ

4 • 2007

БІОХІМІЯ

УДК 577.112.4+577.346+616-006.6

© 2007

Г. П. Копильчук, М. М. Марченко, Г. В. Яковишин

Окиснювальна модифікація білків ядра та постнуклеарної фракції лімфоцитів селезінки попередньо опромінених щурів з трансплантованою карциномою Герена

(Представлено академіком НАН України Д. О. Мельничуком)

The influence of low-dose irradiation and transplanted Guerin's carcinoma on a level of oxidizing modification of chromatin and postnuclear fraction proteins of spleen lymphocytes is studied in rats in the process of oncogenesis. It is established that the processes of oxidation of the proteins of nuclei and the postnuclear fraction of spleen lymphocytes in rats have different dependences on the influence of the low-dose x-ray irradiation preliminary to the Guerin's carcinoma transplantation: nuclear proteins are exposed to the strengthened modifying influence.

Не викликає сумнівів, що іонізуюча радіація може стати причиною канцерогенезу [1, 2]. На сучасному етапі все більше науковців схиляються до думки про те, що немає безпечних доз радіації, і виступають на підтримку безпорогової теорії, згідно з якою навіть фонові дози можуть стати причиною деяких форм раку. Виникнення пухлин при тотальному опроміненні малими дозами пов'язують з посиленим утворенням життєздатних малігнізованих клітин внаслідок збільшення об'єму опромінених тканин [3]. У цьому випадку на особливу увагу заслуговують дослідження віддалених променевих ефектів, у формуванні яких не остання роль належить механізму окиснювальної модифікації білків (ОМБ) як одному з проявів вільнорадикальних процесів, що ініціюються іонізуючою радіацією [4, 5]. Прямою мішенню променевого ураження є селезінка — вторинний орган імунної системи, з яким в основному пов'язане формування гуморальної імунної відповіді у вигляді продукції специфічних імуноглобулінів [6]. Саме порушення в селезінці призводять до наслідків, які розвиваються як пізні прояви радіаційних ефектів, серед яких особливе місце посідає неопластична трансформація клітин [7].

Метою проведеного дослідження було вивчити вплив малих доз радіації та трансплантованої карциноми Герена на рівень окиснювальної модифікації білків хроматину і постнуклеарної фракції лімфоцитів селезінки щурів у процесі онкогенезу, що розвивається на фоні попереднього фракціонованого рентгенівського опромінення.

Дослідження проводили на самках білих безпородних щурів масою 110–130 г. Піддослідні тварини були поділені на групи: I — опромінені тварини (Р); II — тварини з трансплантованою карциномою Герена (Пх); III — тварини, яким по закінченні 7-добового опромінення трансплантували карциному Герена шляхом підшкірного введення в область стегна 30% суспензії пухлинних клітин у фізіологічному розчині (Р + Пх); контрольну групу складали інтактні щури. Опромінення проводили протягом 7 діб у денний час щодобово в дозі $36{,}12 \cdot 10^{-4}$ Кл/кг (13 сГр) на рентгенівській діагностичній установці 12П6 ("Lachema", Чехія) при потужності дози $2{,}58 \cdot 10^{-4}$ Кл/кг (0,93 сГр/с), напрузі 80 кВ, силі струму 40 мА, фільтри 0,5 мм Cu, фокусна відстань 40 см. Тварин опромінювали групами при вільному утриманні в клітці. Щури знаходились на стандартному раціоні віварію та мали вільний доступ до води.

Евтаназію тварин проводили під легким ефірним наркозом на 1-шу, 7-му, 14-ту та 21-шу доби після припинення опромінення, що для пухлиноносіїв відповідають латентній (7-ма доба), логарифмічній (14-та доба) та стаціонарній (21-ша доба) стадії онкогенезу.

Лімфоцити селезінки одержували центрифугуванням клітинної суспензії на градієнті Ficcol-Pague (густина 1,077) за методом [8].

Хроматин виділяли за методом [9]. Гістони екстрагували 0,25 н. H_2SO_4, фракцію лабільнозв'язаних із хроматином негістонових білків — 0,35 М NaCl [10].

Рівень карбонілювання білків оцінювали за кількістю похідних 2,4-динітрофенілгідразону, які утворюються при взаємодії окиснених амінокислотних залишків білків з 2,4-динітрофенілгідразином і виражали в нмоль карбонільних білкових похідних на мг загального білка [11]. Вміст білка визначали за методом [12]. Статистичну обробку результатів проводили з використанням t-критерію Стьюдента.

За даними вивчення окиснення протеїнів у ядрі та постнуклеарній фракції лімфоцитів селезінки, в групі інтактних тварин рівень цього процесу найвищий у гістонах, де досліджуваний показник більший, ніж у постнуклеарних та негістонових білках у 3,5 та 4,4 раза відповідно (рис. 1). Встановлений факт, очевидно, пов'язаний з тим, що окисненню шляхом утворення карбонільних похідних підлягають в першу чергу лізинові та аргінінові залишки [7, 13, 14].

Вплив радіації на процеси ОМБ найбільш виражений у пост'ядерній фракції, де рівень модифікованих продуктів вже на 1-шу добу після опромінення зростає у 5,7 раза порівняно з контролем (див. рис. 1, *а*), у той час як у негістонових білках та гістонах вміст карбонільних похідних переважає контрольні значення лише в 2,7 та 3,6 раза відповідно (див. рис. 1, *б*, *в*).

У міру віддалення від терміну опромінення відбувається зниження рівня окиснювальної модифікації усіх досліджуваних протеїнів. В ядерних білках кожні 7 експериментальних діб досліджуваний показник плавно знижується приблизно у 1,2–1,5 раза (див. рис. 1, *б*, *в*). У постнуклеарній фракції на кінцевих етапах експерименту (21-ша доба) зниження показника відбувається інтенсивніше і досягає 2,5 раза (див. рис. 1, *а*).

Отже, на фоні загального посилення вільнорадикального пошкодження всіх досліджуваних білків при опроміненні найчутливішими до впливу радіації виявились протеїни постнуклеарної фракції. У міру віддалення від терміну опромінення спостерігається згасання ефекту і рівень ОМБ знижується, повертаючись до контрольних значень, лише в гістонах залишається підвищеним в 1,7 раза порівняно з контролем.

Вплив пухлини на ОМБ у лімфоцитах селезінки не є таким односпрямованим, як вплив радіації. Якщо латентна фаза росту пухлини характеризується посиленням процесів утво-

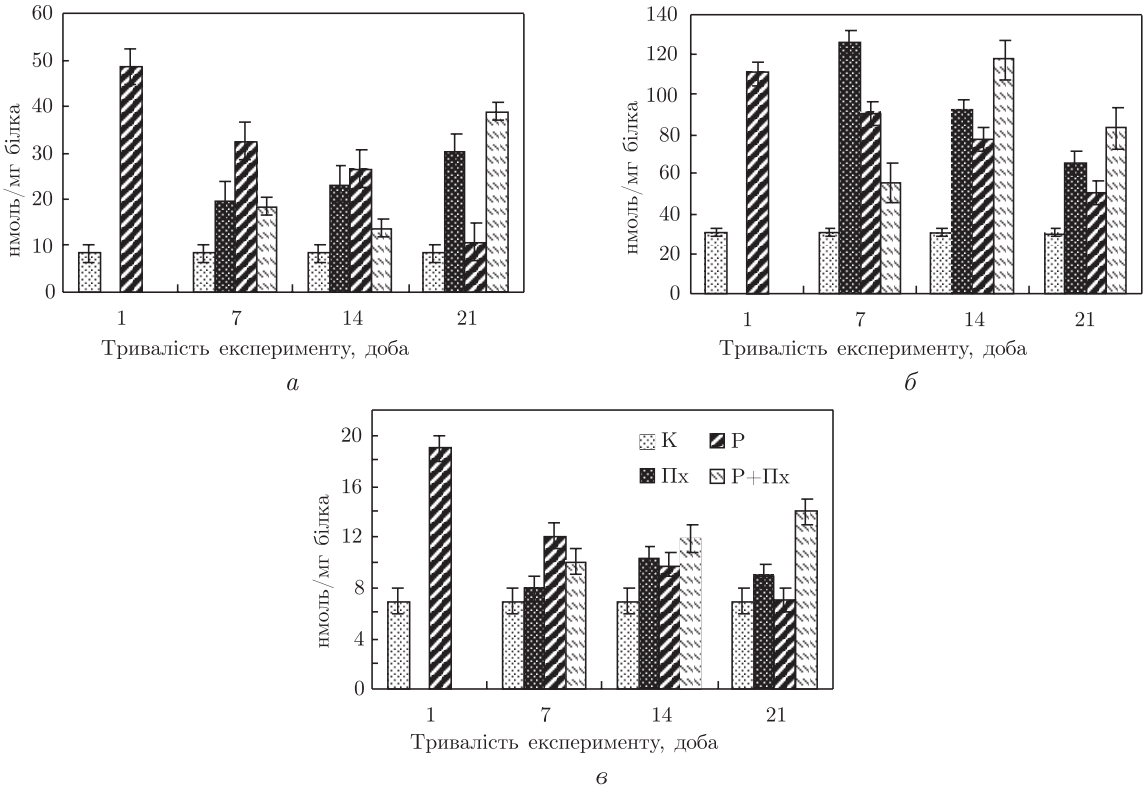

Рис. 1. Вміст карбонільних похідних у фракції пост'ядерних (*а*), гістонових (*б*) та негістонових (*в*) білків лімфоцитів селезінки щурів з трансплантованою карциномою Герена

рення карбонільних похідних у всіх досліджуваних групах білків (особливо в гістонах, де даний показник перевищує контрольні значення в 4,1 раза), то про наступні етапи онкогенезу цього сказати не можна. Так, у логарифмічну фазу росту пухлини тенденція до посилення досліджуваних процесів продовжується у фракції пост'ядерних та негістонових білків, а рівень модифікації гістонів у цей період знижується в 1,4 раза. На термінальному етапі розвитку злоякісного новоутворення (21-ша доба) рівень вільнорадикального пошкодження ядерних білків знижується в середньому в 1,3 раза, у той час як у постнуклеарній фракції досліджуваний показник у стільки ж разів зростає.

Отже, за окремої дії пошкоджуючих чинників відбувається посилення окиснювальної модифікації усіх білків лімфоцитів селезінки в період з 1-ї до 14-ї доби порівняно з групою інтактних тварин. На термінальних етапах експерименту рентгенівське опромінення і карцинома Герена виявляють різноспрямований характер дії. Відбувається згасання ефекту радіаційного впливу у фракції пост'ядерних та негістонових білків, і лише рівень модифікації гістонів залишається підвищеним порівняно з контролем. Дія карциноми Герена в цей період є жорсткішою, що виявляється в посиленому накопиченні карбонільних похідних усіх досліджуваних білків лімфоцитів у групі пухлиноносіїв (див. рис. 1).

Фракціоноване рентгенівське опромінення, що передує трансплантації карциноми Герена, посилює процеси ОМБ на різних етапах онкогенезу. Підвищення в 1,3–1,6 раза вмісту модифікованих продуктів негістонових білків за даних умов спостерігається впродовж усього експериментального періоду (див. рис. 1, *в*). Гістонові білки посилено модифікуються, починаючи з логарифмічної фази росту пухлини (див. рис. 1, *б*). Щодо пост'ядерної

фракції, то вплив попереднього опромінення на процес онкогенезу виражається лише на термінальних етапах і виявляється в підвищенні ОМБ в 1,3 раза (див. рис. 1, *а*).

Отже, ядерні білки лімфоцитів селезінки попередньо опромінених пухлиноносіїв активніше реагують на дію іонізуючої радіації шляхом посилення окиснювальної модифікації, починаючи з ранніх етапів онкогенезу.

1. *Готлиб В. Я., Пелевина И. И., Конопля Е. Ф. и др.* Некоторые аспекты биологического действия малых доз ионизирующей радиации // Радиобиология. – 1991. – **31**, вып. 3. – С. 318–325.
2. *Zhao Y. L., Piao C. Q., Hall E. J. et al.* Mechanisms of Radiation-Induced Neoplastic Transformation of Human Bronchial Epithelial Cells // Radiat. Res. – 2001. – **155**. – P. 230–234.
3. *Вайнберг М. Ш.* Радиация и опухоль. – Москва: Знание, 1985. – 64 с.
4. *Дубинина Е. Е.* Роль активных форм кислорода в качестве сигнальных молекул в метаболизме тканей при состояниях окислительного стресса // Вопр. мед. химии. – 2001. – **47**, № 6. – С. 561–581.
5. *Дубинина Е. Е., Шугалей И. В.* Окислительная модификация белков // Успехи соврем. биологии. – 1993. – **113**, вып. 1. – С. 71–79.
6. *Лупырь В. М., Торяник И. И.* Клеточная популяция селезенки (рентгеновское и постлучевое лазерное облучение) // Укр. мед. альманах. – 1998. – № 2. – С. 141–142.
7. *Кірпенко Т. О., Кондрічин І. М., Остапченко Л. І., Кучеренко М. Е.* Вплив іонізувальної радіації на регуляцію рецепторних тирозинових протеїнкіназ із лімфоцитів селезінки щура // Укр. радіол. журн. – 2001. – № 9. – С. 303–305.
8. *Boyum A.* Separation of leucocytes from blood and bone marrow // Scand. J. Clin. Lab. Invest. – 1968. – **21**, Suppl. 97. – P. 28–30.
9. *Уманский С. Р., Ковалев Ю. К., Пипер Е. Г.* Взаимодействие негистоновых белков хроматина с гомологичной и гетерологичной ДНК // Молекуляр. биология. – 1975. – **9**, № 5. – С. 683–690.
10. *Техника* биохимического исследования субклеточных структур и биополимеров растительной клетки / Под. ред. А. С. Вечера. – Минск: Наука и техника, 1986. – 197 с.
11. *Дубинина Е. Е., Бурмистров С. О., Ходов Д. А., Поротов И. Г.* Окислительная модификация белков сыворотки крови человека, метод ее определения // Вопр. мед. химии. – 1995. – **41**, № 1. – С. 24–26.
12. *Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J.* Protein measurement with the Folin phenol reagent // J. Biol. Chem. – 1951. – **193**. – P. 265–275.
13. *Дубініна О. Ю.* Окиснювальний стрес і окиснювальна модифікація білків // Мед. хімія. – 2001. – **3**, № 2. – С. 5–11.
14. *Stadtman E. R., Oliver C. N.* Metal-catalyzed oxidation of proteins. Physiological consequences // J. Biol. Chem. – 1995. – **266**, No 4. – P. 2005–2008.

Чернівецький національний університет ім. Юрія Федьковича

Надійшло до редакції 27.10.2006