



УДК 576.311.347+576.385.5

© 2011

М. М. Марченко, Г. П. Копильчук, О. М. Волощук

### **Активність ферментів енергозабезпечення карциноми Герена, трансплантованої на фоні попереднього опромінення малими дозами**

*(Представлено членом-кореспондентом НАН України Н. М. Гулою)*

*Досліджено інтенсивність набухання мітохондрій трансформованої тканини,  $H^+$ -АТФазну і сукцинатдегідрогеназну активності в динаміці росту карциноми Герена за умов попереднього фракціонованого опромінення малими дозами. Встановлено, що в динаміці пухлинного росту відбувається посилення набухання мітохондрій трансформованої тканини. Попереднє опромінення малими дозами спричинює посилення високоамплітудного набухання мітохондрій та зниження активностей досліджуваних мітохондріальних мембранозв'язаних ферментів уже на латентній стадії онкогенезу.*

Однією з причин порушення енергетичного метаболізму може бути індукція неспецифічної проникності мітохондріальних мембран, що реєструється за набуханням мітохондрій [1]. Маркерними ферментами ефективності функціонування системи енергетичного забезпечення клітини вважають  $H^+$ -АТФазу і сукцинатдегідрогеназу [2, 3].

Мета нашого дослідження полягала у вивченні змін показників інтенсивності набухання мітохондрій,  $H^+$ -АТФазної та сукцинатдегідрогеназної активностей мітохондріальної фракції карциноми Герена в динаміці її росту на фоні попереднього фракціонованого опромінення малими дозами радіації.

Дослідження проводили на білих безпородних щурах масою 110–130 г. Тварини були поділені на дві групи: I — тварини з трансплантованою карциномою Герена (Пх); II — попередньо опромінені пухлиноносії (Пх + Р).

Опромінення проводили протягом семи діб щодобово в дозі  $36,12 \cdot 10^{-4}$  Кл/кг (загальна доза  $258 \cdot 10^{-4}$  Кл/кг) 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, шкірно-фокусній відстані 40 см з використанням фільтрів 0,5 мм Cu.

Трансплантацію карциноми Герена здійснювали шляхом підшкірного введення 0,5 мл 30% суспензії ракових клітин в ізотонічному розчині натрію хлориду. Штам пухлини нада-

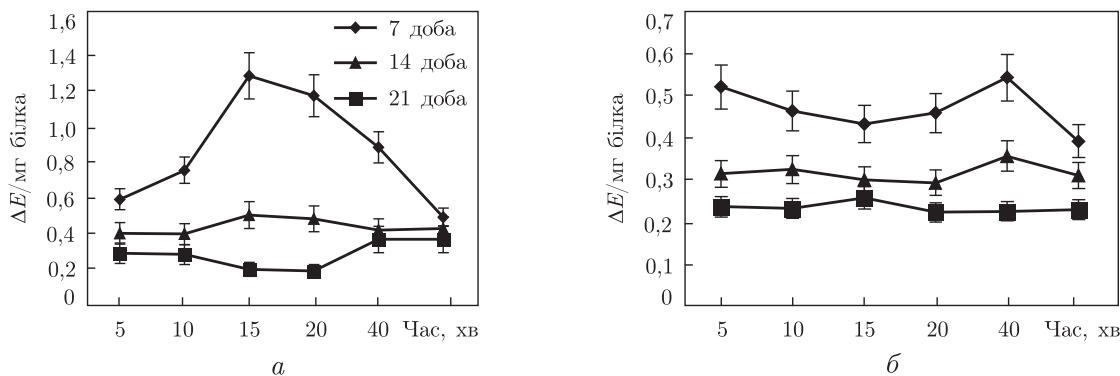


Рис. 1. Набухання мітохондрій трансформованої тканини щурів з трансплантованою карциною Герена (а) та попередньо опромінених щурів-пухлиноносіїв (б)

ний Інститутом експериментальної патології, онкології і радіобіології ім. Р. Є. Кавецького НАН України.

Тривалість експерименту становила 21 добу. Евтаназію проводили на 7-му (латентна стадія пухлинного росту), 14-ту (логарифмічна стадія пухлинного росту), 21-шу (термінальна стадія пухлинного росту) добу після трансплантації пухлини під легким ефірним наркозом.

Мітохондріальну фракцію з гомогенату трансформованої тканини отримували методом диференційного центрифугування [4]. Усі операції проводили при 0–3 °С. Чистоту мітохондріальної фракції контролювали за співвідношенням ДНК/білок та шляхом порівняльного визначення глюкозо-6-фосфатазної активності у фракціях мікосом та мітохондрій [5].

При вивченні кінетики набухання реєстрували оптичну густину суспензії мітохондрій при 520 нм [6]. Оптичну густину розраховували за середнім показником зміни вихідної оптичної густини і середнього приросту  $\Delta E$  за час дослідження, перерахованого на 1 мг білка мітохондрій. Зменшення оптичної густини свідчить про зростання ступеня набухання мітохондрій [7, 8].

Сукцинатдегідрогеназну активність [КФ 1.3.99.1] визначали за інтенсивністю відновлення калію фериціаніду [9],  $H^+$ -АТФазну активність [КФ 3.6.1.3] — за накопиченням неорганічного фосфату [10].

Статистичну обробку даних виконували з використанням  $t$ -критерію Стюдента.

Результати досліджень показали, що в динаміці росту карциноми Герена спостерігається посилення набухання мітохондрій трансформованої тканини (рис. 1, а), максимальний рівень якого фіксується на термінальних етапах пухлинного росту, що супроводжується втратою мітохондріями здатності регулювати свій об'єм [6]. Оскільки набухання супроводжується індукцією неспецифічної проникності мітохондріальних мембран і зниженням мембранного потенціалу [1], то виражене набухання мітохондрій у динаміці росту карциноми Герена може призводити до втрати їх здатності синтезувати АТФ.

Згідно з одержаними даними, підвищення проникності мітохондріальних мембран впродовж росту карциноми Герена супроводжується зниженням  $H^+$ -АТФазної активності (рис. 2, а). Так, на логарифмічній та термінальній стадіях показник  $H^+$ -АТФазної активності зменшується вдвічі порівняно з періодом латентного росту. Крім встановленої нами тенденції до взаємозв'язку між інтенсифікацією процесів набухання мітохондрій та зниженням  $H^+$ -АТФазної активності, за даними літератури [11, 12], причиною зміни функціональної активності досліджуваного ферменту може бути порушення синтезу окремих субодиниць

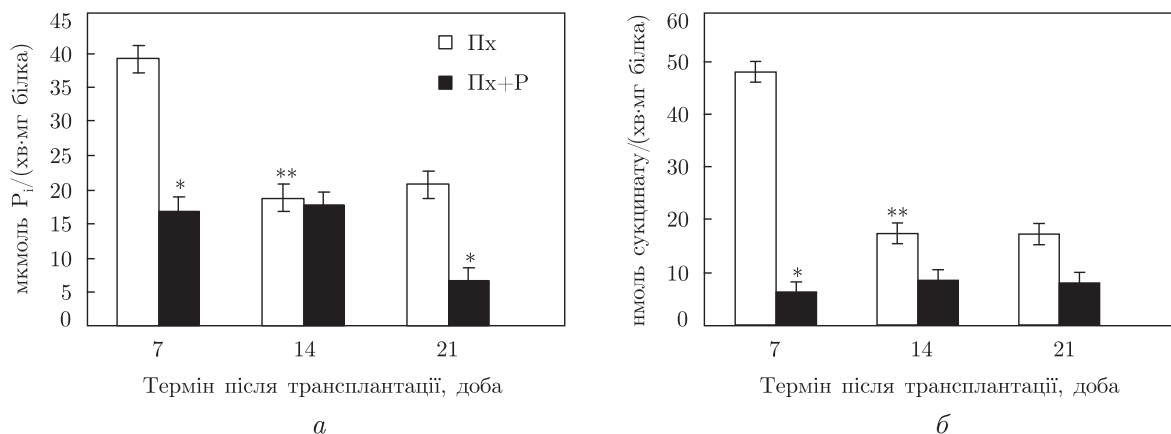


Рис. 2.  $H^+$ -АТФазна (а) та сукцинатдегідрогеназна (б) активність мітохондрій карциноми Герена попередньо опроміненних пухлиноносіїв.

Пх — пухлиноносії; Пх + Р — попередньо опромінені пухлиноносії. \* — вірогідна різниця порівняно з неопроміненними пухлиноносійми; \*\* — вірогідна різниця порівняно з попередньою стадією пухлинного росту

АТФази, дві з яких кодуються мітохондріальним геномом, або посилений синтез білка-інгібітора АТФази в мітохондріях трансформованої тканини.

Підвищення проникності мітохондріальних мембран спричиняє порушення функціонування дихального ланцюга. Свідченням цього може бути експериментально встановлене нами зниження сукцинатдегідрогеназної активності у 2,8–3 рази (див. рис. 2, б) на логарифмічній та стаціонарній стадіях пухлинного росту порівняно з латентною стадією.

Імовірно, що виявлені порушення функціонування  $H^+$ -АТФази і сукцинатдегідрогенази можна розглядати як одну з причин переключення шляхів енергозабезпечення злоякісно трансформованих клітин на гліколіз [13].

Експериментальне вивчення впливу передуючого трансплантації карциноми Герена опромінення малими дозами радіації показало посилення деструктивних змін мітохондрій злоякісного новоутворення, одним з проявів чого є інтенсифікація процесів набухання мітохондрій на латентній стадії росту пухлини (див. рис. 1, б) порівняно з мітохондріями трансформованої тканини неопроміненних щурів-пухлиноносіїв (див. рис. 1, а). Проте на подальших етапах онкогенезу інтенсивність набухання мітохондрій в обох досліджуваних групах тварин достовірно не відрізняється.

Поряд зі зниженням осмотичної стійкості мітохондрій уже на латентній стадії пухлинного росту попереднє фракціоноване рентгенівське опромінення зумовлює зниження активності досліджуваних мітохондріальних мембранозв'язаних ферментів. На 7-му добу росту карциноми Герена  $H^+$ -АТФазна та сукцинатдегідрогеназна активності в групі опроміненних пухлиноносіїв в 2,3 та 6 разів відповідно нижчі порівняно з неопроміненними пухлиноносійми. На термінальних етапах експерименту спостерігається подальше гальмування  $H^+$ -АТФазної активності (див. рис. 2, а), тоді як для сукцинатдегідрогеназної активності характерне збереження встановленої на стадії активного росту пухлини тенденції (див. рис. 2, б).

Отже, попереднє фракціоноване рентгенівське опромінення малими дозами спричиняє посилення набухання мітохондрій зі зниженням сукцинатдегідрогеназної та АТФазної активностей, тим самим поглиблюючи деструктивні зміни в системі аеробного енергозабезпечення клітин карциноми Герена.

1. Брайловская И. В., Старков А. А., Мохова Е. Н. Индукция  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимой поры в митохондриях печени под действием аскорбата в присутствии низких концентраций ионов железа // Биохимия. – 2001. – **66**, вып. 8. – С. 1117–1121.
2. Литошенко А. Я. АТФ-синтаза – внутриклеточная молекулярная турбина // Укр. біохім. журн. – 2001. – **73**, № 5. – С. 8–15.
3. Кургалюк Н. М. Стан мітохондріального дихання та окиснювального фосфорилування у печінці білих щурів за умов рентгенівського опромінення та введення  $\alpha$ -кетоглутарату натрію // Фізіол. журн. – 2000. – **46**, № 5. – С. 63–69.
4. Шабалина И. Г., Колосова Н. Г., Гришкова А. Ю. и др. Активность окислительного фосфорилирования  $\text{F}^0\text{F}^1$ -АТФ-азы и содержание цитохромов митохондрий печени крыс с врожденным повышением способности радикалообразования // Биохимия. – 1995. – **60**, вып. 12. – С. 2045. – 2052.
5. Kagan J., Srivastava S. Mitochondria as a target for early detection and diagnosis of cancer // Crit. Rev. Clin. Lab. Sci. – 2005. – **42**, No 5–6. – P. 453–472.
6. Лидер В. А., Богданов Н. Г. Влияние нафтохинонов и токоферолов на изменение объема митохондрий // Укр. біохім. журн. – 1985. – **57**, № 1. – С. 82–85.
7. Аконова О. В., Сагач В. Ф. Индукция открытия митохондриальной поры под действием  $\text{Ca}^{2+}$  в миокарде крыс // Укр. біохім. журн. – 2004. – **76**, № 1. – С. 48–55.
8. Сагач В. Ф., Вавилова Г. Л., Рудик О. В., Струтинська Н. А. Вивільнення неіндетифікованих речовин мітохондріального походження – показник відкриття мітохондріальної пори серця щурів // Фізіол. журн. – 2003. – **49**, № 5. – С. 3–12.
9. Саакян И. Р., Карапетян Т. Д., Саакян Г. Г. Митохондрии в реализации антигенного напряжения организма у крыс // Вопр. мед. химии. – 2001. – **47**, № 2. – С. 217–226.
10. Габиров М. М. Влияние гипербарической оксигенации на активность протонной АТФ-азы митохондрий различных тканей крыс // Укр. біохім. журн. – 1986. – **58**, № 5. – С. 81–83.
11. Brandon M., Baldi P., Wallace D. C. Mitochondrial mutations in cancer // Oncogene. – 2006. – **25**. – P. 4647–4662.
12. Huss M., Sasse F., Kunze B. et al. Archazolid and apicularen: novel specific V-ATPase inhibitors // BMC Biochemistry. – 2005. – **6**. – P. 13–22.
13. Мишуніна Т. М. Механізми, переваги та наслідки активації гліколізу у пухлинних клітинах // Журн. АМНУ. – 2009. – **15**, № 3. – С. 417–448.

Чернівецький національний університет  
ім. Юрія Федьковича

Надійшло до редакції 30.04.2010

**M. M. Marchenco, G. P. Kopyl'chuk, O. M. Voloschuk**

### **The activity of energy-providing enzymes of Guerin's carcinoma transplanted under a preliminary low-dose irradiation**

*The intensity of mitochondria swelling and the  $\text{H}^+$ -ATP-ase and succinate dehydrogenase activities are studied in the dynamics of Guerin's carcinoma growth under condition of preliminary low-dose irradiation. The increase of Guerin's carcinoma mitochondria swelling with a maximum at terminal stages with a tendency of inhibition of the  $\text{H}^+$ -ATP-ase and succinate dehydrogenase activities is determined. Low-dose preliminary irradiation caused an increase of high amplitude mitochondria swelling and a decrease of studied activities of mitochondria membrane-associated enzymes at the latent stage of oncogenesis as compared with those in unirradiated rats with tumor.*