

УДК 577.112+616-006.6+614.876
©Коллектив авторов

ВЛИЯНИЕ МАЛЫХ ДОЗ РЕНТГЕНОВСКОГО ОБЛУЧЕНИЯ НА ДЕТОКСИКАЦИОННУЮ СИСТЕМУ ПЕЧЕНИ КРЫС С ТРАНСПЛАНТИРОВАННОЙ КАРЦИНОМОЙ ГЕРЕНА

М.М. Марченко, Г.П. Копыльчук, О.В. Кеца*

Черновицкий национальный университет имени Юрия Федьковича,
г. Черновцы, ул. Коцюбинского, 2, 58012 Украина; тел.: 8(0372)58-48-38;
эл. почта: ketsa80@mail.ru

Проведено исследование активности ферментов системы детоксикации в микросомальной фракции печени предварительно облученных крыс-опухоленосителей. Показано, что облучение организма, предшествующее трансплантации карциномы Герена, приводит к снижению ферментативной активности цитохрома Р450 и глутатионтрансферазы в микросомальной фракции печени в латентную и логарифмическую фазы онкогенеза в сравнении с необлученными опухоленосителями. Показано, что снижение гидроксилазной активности цитохрома Р450 может быть следствием его перехода в неактивную форму – цитохром Р420.

По мере отдаления от срока облучения – в стационарный период онкогенеза, определяющим фактором в изменении изучаемых показателей является развитие опухоли, поскольку активность компонентов I и II фаз детоксикации приближается к показателям необлученных крыс-опухоленосителей.

Ключевые слова: цитохром Р450, глутатионтрансфераза, микросомальная фракция, печень, карцинома Герена.

* - адресат для переписки

ВВЕДЕНИЕ. Ведущую роль в детоксикации организма занимают реакции, катализируемые ферментами системы монооксигеназ эндоплазматического ретикулаума (ЭПР) печени [1, 2]. Ферментативная система многоцелевых оксигеназ осуществляет гидроксилирование эндогенных и экзогенных гидрофобных соединений, что делает их более доступными для обезвреживания компонентами второй фазы биотрансформации – глутатионтрансферазами [3]. Изменение детоксикационной функции печени может быть следствием влияния множества факторов окружающей среды. К последним принадлежит и ионизирующая радиация. Воздействие на организм ионизирующего излучения сопровождается инициацией свободнорадикальных процессов печени с максимальной скоростью в эндоплазматическом ретикулуме клеток [4]. Активация процессов окисления биомолекул вследствие облучения может стать не только причиной нарушения детоксикационной функции печени, но и развития злокачественных новообразований в организме [5].

Учитывая выше изложенное, целью данной работы явилось исследование гидроксилазной активности цитохрома P450 и глутатионтрансферазной активности микросомальной фракции печени предварительно облученных крыс-опухоленосителей.

МЕТОДИКА. В работе использованы самки белых беспородных крыс массой 130-150 г. Животные были разделены на 4 группы: I – интактные животные (контроль); II – облученные крысы; III – крысы с трансплантированной карциномой Герена; IV – крысы с карциномой Герена, трансплантированной на фоне предварительного облучения в малых дозах.

Облучение животных осуществляли в течение 7 суток ежедневно в экспозиционной дозе $36,12 \cdot 10^{-4}$ Кл/кг на аппарате 12П6 („Lachema”, Чехия) при следующих условиях: напряжение 80 кВ, сила тока 40 мА, фильтры 0,5 мм Cu, кожно-фокусное расстояние 40 см, мощность дозы $2,58 \cdot 10^{-4}$ Кл/кг. Суммарная доза облучения составила 25,3 мКл/г. По окончании облучения животным IV-й группы трансплантировали карциному Герена по методике [6]. Эвтаназию животных осуществляли под лёгким эфирным наркозом на 1, 7, 14, 21-е сутки после облучения, что для опухоленосителей соответствует латентной (7 сутки), логарифмической (14 сутки) и стационарной (21 сутки) стадиям онкогенеза.

Микросомальную фракцию печени крыс получали путем дифференциального центрифугирования [7]. В суспензии микросомальной фракции определяли N-деметилазную и n-гидроксилазную активность цитохрома P450 [8], глутатионтрансферазную активность [9] в перерасчете на 1 мг белка. Содержание белка в пробах определяли по методу Лоури [10].

Степень инактивации цитохрома P450 регистрировали по дифференциальным спектрам поглощения его восстановленных карбоксикомплексов [11]. Скорость инактивации рассчитывали по разности оптического поглощения при длинах волн 420 и 450 нм ($\Delta A_{420-450}$) на 1 нмоль цитохрома P450 в 1 мин. Содержание цитохрома P450 определяли по двухлучевой схеме методом Omura и Sato [12].

Полученные данные обрабатывали статистически по методу Стьюдента. Различия считали статистически значимыми при $p \leq 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ. В результате проведенных исследований обнаружено, что действие малых доз ионизирующего излучения ведет к существенным нарушениям функциональной активности ферментов I и II фаз детоксикации, проявляющимся в период первой недели после облучения. Так, в микросомальной фракции печени крыс, подвергшихся воздействию малых доз радиации в течение семи дней, происходит достоверное уменьшение N-деметилазной и n-гидроксилазной активностей цитохрома P450 в первые сутки после облучения, сохраняющееся до 7 суток (рис. 1 а, б). В то же время, глутатионтрансферазная активность микросомальной фракции печени крыс превышает показатели контроля в 1,3 раза (рис. 2). По мере отдаления от периода облучения наблюдается восстановление детоксикационной функции печени крыс до показателей контрольной группы.

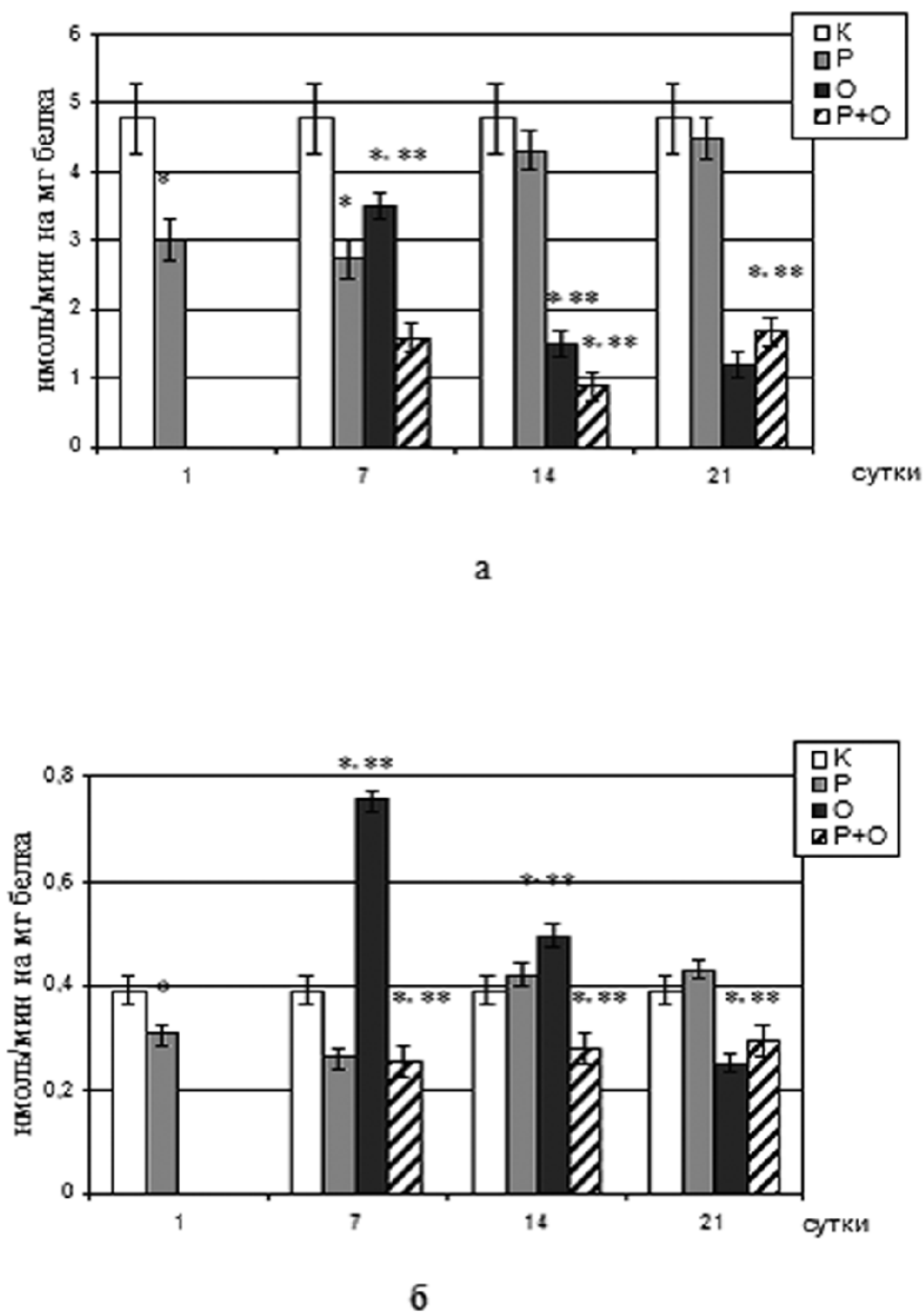


Рисунок 1.

Гидроксилазная активность цитохрома Р-450 в микросомальной фракции печени предварительно облученных крыс-опухоленосителей

Примечание: К - intactные животные; Р - облученные животные; О - животные, которым трансплантировали опухолевые клетки; Р+О - животные, которым по окончании 7-ми суточного облучения трансплантировали опухолевые клетки; а - N-деметилазная активность, б - p-гидроксилазная активность; * - статистически достоверная разница в сравнении с контрольным показателем ($p \leq 0,05$); ** - статистически достоверная разница в сравнении с показателем крыс-опухоленосителей ($p \leq 0,05$).

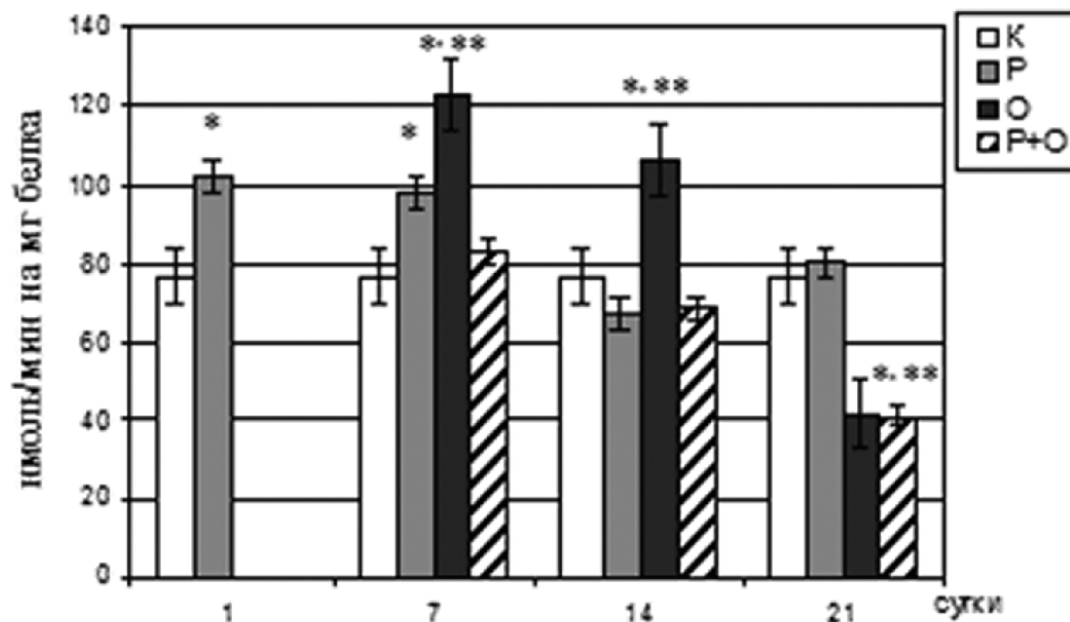


Рисунок 2.

Глутатионтрансферазная активность в микросомальной фракции печени предварительно облученных крыс-опухоленосителей

Примечание: К - интактные животные; Р - облученные животные; О - животные, которым трансплантировали опухолевые клетки; Р+О - животные, которым по окончании 7-ми суточного облучения трансплантировали опухолевые клетки; * - статистически достоверная разница в сравнение с контрольным показателем ($p \leq 0,05$); ** - статистически достоверная разница в сравнение с показателем крыс-опухоленосителей ($p \leq 0,05$).

Несбалансированность системы детоксикации печени крыс при действии малых доз облучения, проявляющаяся в разнонаправленности изменений гидроксилазной и глутатионтрансферазной активностей, может являться следствием усиления свободнорадикальных процессов микросомальных мембран [13]. При этом возможно окисление SH-групп активного центра цитохрома Р450 и его трансформация в высокоспиновый цитохром Р420 (рис. 3а). Следствием этого процесса, по-видимому, и является, установленное нами, уменьшение скорости гидроксилирования субстратов I и II-го типов. В то же время, повышенная глутатионтрансферазная активность в микросомальной фракции печени предварительно облученных крыс может быть следствием активации ферментативной антиоксидантной системы печени, поскольку, глутатионтрансфераза, помимо детоксикационной функции, выполняет функции антиоксидантной защиты клеток печени [14, 15].

Таким образом, действие ионизирующей радиации сопровождается дисфункцией системы биотрансформации только в короткое время после облучения с последующей её нормализацией на 14, 21 сутки.

Известно [16], что развитие в организме злокачественного образования сопровождается усиленным продуцированием токсических для организма веществ, основная часть которых обезвреживается клетками печени. Поэтому исследование активностей компонентов детоксикационной системы печени крыс на разных стадиях развития опухоли в организме может служить критерием генотоксического действия продуктов метаболизма опухолевой ткани на отдалённые органы.

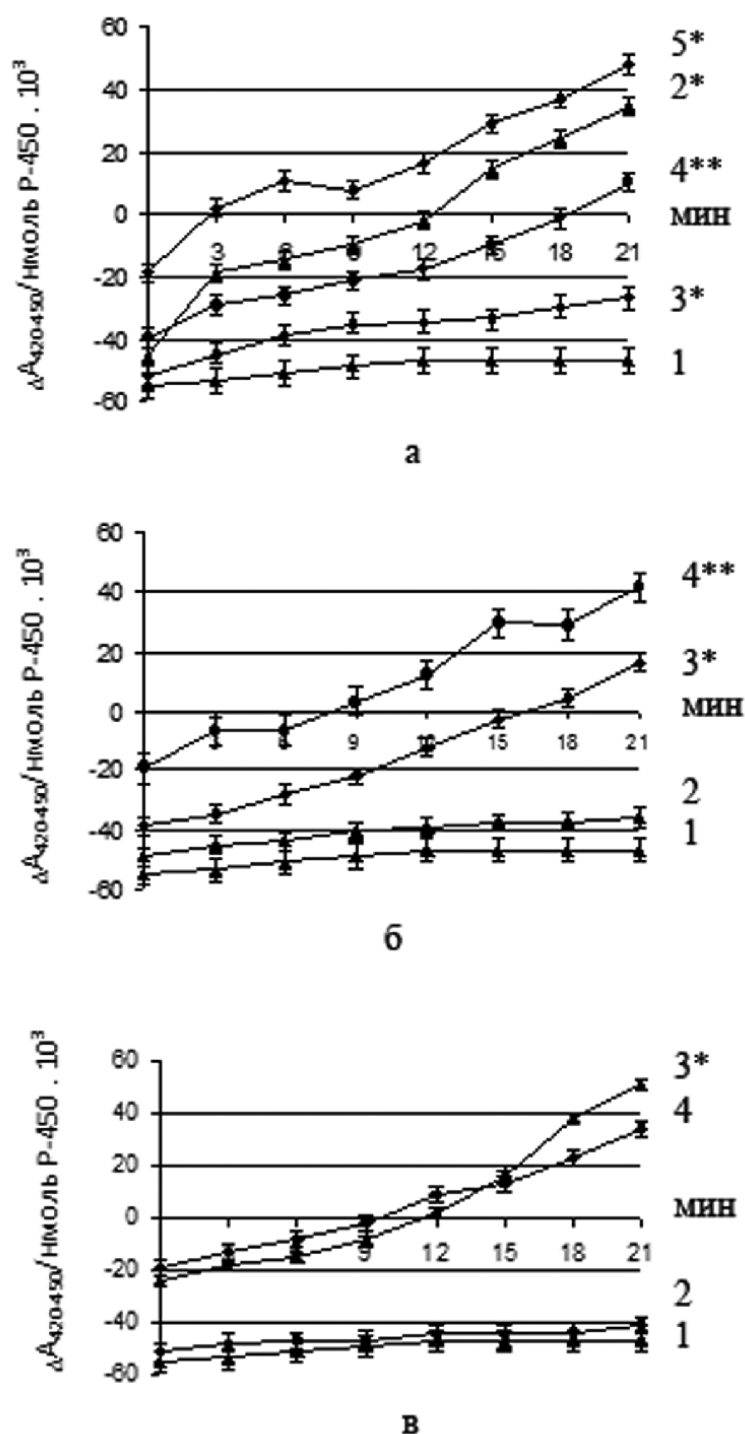


Рисунок 3.

Скорость инактивации цитохрома Р450 в микросомальной фракции печени предварительно облученных крыс-опухоленосителей

Примечание: 1 - интактные животные; 2 - облученные животные; 3 - животные с трансплантированной карциномой Герена; 4 - животные, которым по окончании 7-ми суточного облучения трансплантировали карциному Герена; 5 - крысы на 1-е сутки после облучения; а, б, в - на 7, 14, 21-е сутки после действия радиации и трансплантации опухоли; * - статистически достоверная разница в сравнение с контрольным показателем ($p \leq 0,05$); ** - статистически достоверная разница в сравнение с показателем крыс-опухоленосителей ($p \leq 0,05$).

ВЛИЯНИЕ ОБЛУЧЕНИЯ НА МИКРОСОМЫ КРЫС-ОПУХОЛЕНОСИТЕЛЕЙ

Из данных представленных на рисунках 1 и 2 видно, что развитие опухоли на 7-е сутки после трансплантации приводит к снижению в 1,4 раза гидроксилирования диметиланилина, в то время как гидроксилирование анилина микросомальным цитохромом P450 в печени крыс-опухоленосителей повышается в 1,9 раза по сравнению с контролем.

Такие различия скорости гидроксилирования субстратов I и II типов могут быть связаны с ранее обнаруженными нами изменениями липидного слоя мембран ЭПР печени при росте новообразования в организме [17]. Поскольку местом взаимодействия субстратов I типа с гемопротеином является гидрофобный участок апофермента [18, 19], то весьма вероятно, что в микросомальной мембране в формировании его принимают участие фосфолипиды. Свободнорадикальные состояния последних могут придавать апоферменту цитохрома P450 определенные конформации и тем самым понижать N-деметилазную активность последнего, что приводит к компенсаторной активации n-гидроксилирования анилина [20, 21]. В то же время, скорость перехода цитохрома P450 в неактивную форму – цитохром P420 повышается незначительно (рис. 3), что свидетельствует о целостности гема цитохрома P450, погруженного внутрь белковой молекулы.

Что касается фермента II фазы детоксикации, то глутатионтрансферазная активность повышается в 1,6 раза в микросомальной фракции печени крыс-опухоленосителей по сравнению с контролем.

На дальнейших этапах онкогенеза (14, 21 сутки) наблюдается снижение не только гидроксилазной активности цитохрома P450 (рис. 1) в результате повышенной скорости его перехода в цитохром P420 (рис. 3 а,б), но и снижение глутатионтрансферазной активности (рис. 2) микросомальной фракции крыс-опухоленосителей.

Таким образом, развитие в организме карциномы Герена на начальных стадиях приводит к активации детоксикационной системы печени опухоленосителей, однако по мере развития новообразования снижается активность ферментов I и II фаз биотрансформации токсических веществ. Вероятно, интенсивное накопление продуктов метаболизма опухоли превышает возможности системы биотрансформации ксенобиотиков печени крыс-опухоленосителей, что и наблюдается в стационарной фазе онкогенеза (рис. 1, 2, 3в).

Учитывая факт влияния низких доз радиации на образование и развитие опухоли в организме, нами было исследовано действие ионизирующего излучения на нетрансформированные ткани организма, в котором развивается опухолевый “зародыш”.

Анализ полученных данных показал, что развитие карциномы Герена в предварительно облученном организме приводит к снижению ферментативной активности компонентов детоксикации микросомальной фракции печени. Так, на 7-е сутки после облучения снижается в 2,2 раза гидроксилирование диметиланилина и в 3 раза гидроксилирование анилина по сравнению с необлученными опухоленосителями, что приближает исследуемые показатели к показателям группы облученных крыс без опухоли (рис. 1 а, б). Одновременно повышается скорость перехода цитохрома P450 в его неактивную форму P420, однако коэффициент инактивации не достигает показателей облученных животных (рис. 3а). Что касается ключевого фермента II фазы биотрансформации, то глутатионтрансферазная активность в предварительно облученных крыс-опухоленосителей снижается в 1,5 раза сравнительно с облученными (рис. 2).

Установленные нами изменения в системе I и II фаз детоксикации облученных крыс-опухоленосителей наблюдаются и в логарифмическую фазу онкогенеза. Однако, в этот период в облученном организме в большей степени сказывается развитие новообразования, поскольку, как отмечено выше, на этой стадии действие предварительного облучения нивелируется. Следует подчеркнуть, что в большей степени ингибируются компоненты I фазы биотрансформации, а именно, гидроксилирование анилина цитохромом P450, что, возможно, связано

с переходом гемопротейна в его неактивную форму – Р420, поскольку коэффициент тепловой инактивации цитохрома Р450 превышает в 2,4 раза показатели группы необлученных опухоленосителей (рис. 3б).

В стационарный период опухолевого роста ферментативная активность компонентов I и II фаз детоксикации в микросомальной фракции печени не отличается от показателей необлученных опухоленосителей.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ И ВЫВОДЫ. Полученные данные позволяют заключить, что развитие в организме карциномы Герена приводит к активации реакций детоксикационной системы печени, что выражается в повышении ферментативной активности основных ее компонентов – цитохрома Р450 и глутатионтрансферазы в латентную и логарифмическую фазы онкогенеза.

Действие облучения, предшествующего трансплантации опухоли крысам, приводит к снижению ферментативных активностей цитохрома Р450 и глутатионтрансферазы в микросомальной фракции печени на соответствующих стадиях роста опухоли по сравнению с необлученными опухоленосителями. В то же время, повышается скорость тепловой инактивации цитохрома Р450. В более отдаленные сроки от облучения исследуемые показатели приближаются к показателям группы необлученных опухоленосителей.

ЛИТЕРАТУРА

1. Ozben T. (2006) FEBS Lett., **580**(12), 2903-2909.
2. Aiba T., Toshinaga M., Ishida K. (2005) Biol. Pharm. Bull., **28**, 311-315.
3. Kim S.K., Abdelmegeed M.A., Novak R.F. (2006) J. Pharmacol. Exp. Ther., **316**(3), 1255-1261.
4. Bonner W.M. (2003) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **100**(9), 4973-4975.
5. Pant M.C., Liao X.-Y., Lu Q., Mollois S., Elmore E., Redpath J.L. (2003) Carcinogenesis, **24**, P. 1961–1965.
6. Марченко М.М., Копильчук Г.П., Григорьева О.В. (2000) Доп. НАН Украины, **3**, 192-195.
7. Schenkman J.B., Cinti D.L. (1978) Methods in Enzymology, **52**, 83-89.
8. Орехович В.Н. (1977) Современные методы в биохимии, Медицина, М.
9. Власова С.Н., Шабунина Е.И., Переслечина И.А. (1990) Лаб. дело, №8, 19-21.
10. Lowry O.H., Rosebrough M.J., Farr A.L., Randal R.J. (1951) J. Biol. Chem., **193**, 265-275.
11. Мохосоев И.М., Кузнецова Г.П., Альтерман М.А., Бачманова Г.И., Арчаков А.И. (1987) Биохимия, **52**, 1649-1658.
12. Omura T., Sato R. (1964) J. Biol. Chem., **239**, 2379-2385.
13. Borge N., Gazzoni I., Barberi M., Colombo S., Pedrazzini E. (2001) Mol. Biol. Cell, **12**, 2482-2496.
14. Hemachand T., Gopalakrishnan B., Salunke D.M., Totey S.M., Shaha C. (2002) J. Cell Sci., **115**, 2053–2065.
15. Singh S.P., Janecki A.J., Srivastava S.K., Awasthi S., Awasthi Y.C., Xia S.J., Zimniak P. (2002) J. Biol. Chem., **277**, 4232–4239.
16. Celis J.E., Gromova I., Gromov P. (2006) FEBS Lett., **580**(12), 2935-2944.
17. Кеца О.В., Марченко М.М. (2005) Укр. биохим. журн., **77**, 141–146.
18. Starr J.R., Chen C., Doody D.R. (2005) Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev., **14**, 2183-2190.
19. Soini Y., Pääkkö P., Lehto V. (1998) Am. J. Pathol., **153**, 1041–1053.
20. Weng Y., DiRusso C.C., Reilly A.A., Black P.N., Ding X. (2005) J. Biol. Chem., **280**, 31686–31698.
21. Nebert D.W., Dalton T.P., Okey A.B., Gonzalez F.J. (2004) J. Biol. Chem., **279**, 23847–23850.

Поступила: 31. 03. 2008.

LOW DOSES X-RAY IRRADIATION INFLUENCE ON LIVER DETOXICATION SYSTEM
IN RATS WITH TRANSPLANTED GUERIN'S CARCINOMA

M.M. Marchenko, G.P. Kopyl'chuk, O.V. Ketsa

Fedkovich Chernivtsy National University, Kotsyubinskogo street, 2, Chernivtsy, 58012 Ukraine;
tel.: 8(0372)58-48-38; e-mail: ketsa80@mail.ru

The activity of detoxication enzymes in liver microsomal fraction of preliminary radiation-exposed rats was investigated. It was shown that preliminary organism exposure to radiation reduced cytochrome P450 and glutathione-S-transferase activity in liver microsomal fraction in the latent and logarithmic phases of oncogenesis compared with the unirradiated rats with tumor.

Low level of cytochrome P450 activity can be caused by transition of microsomal cytochrome P450 in P420 inactive form.

The preliminary radiation does not influence the enzyme activity of liver cytochrome P450 and glutathione-S-transferase on terminal stages of Guerin's carcinoma growth.

Key words: cytochrome P450, glutathione-S-transferase, microsomal fraction, liver, Guerin's carcinoma.