

УДК 616-006.6: 576.311+577.113

©Коллектив авторов

ИЗМЕНЕНИЕ СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ ОРГАНИЗАЦИИ ЦИТОХРОМНОГО УЧАСТКА ДЫХАТЕЛЬНОЙ ЦЕПИ КАРЦИНОМЫ ГЕРЕНА ПРЕДВАРИТЕЛЬНО ОБЛУЧЕННЫХ ОПУХОЛЕНОСИТЕЛЕЙ

О.Н. Волощук*, М.М. Марченко, М.С. Мудрак

Черновицкий национальный университет имени Юрия Федьковича,
г. Черновцы, ул. М. Коцюбинского, 2, 58000 Украина; тел.: (0373)58-48-38;
эл. почта: oxbm@mail.ru

Исследованы особенности структурно-функциональной организации цитохромного участка дыхательной цепи карциномы Герена в динамике опухолевого роста и в условиях предварительного облучения опухоленосителей малыми дозами радиации. Показано, что в динамике онкогенеза в группах облученных и необлученных опухоленосителей наблюдается снижение содержания митохондриальных цитохромов *a*, *b* и *c* с максимумом на терминальной стадии роста карциномы Герена. На начальных стадиях онкогенеза низкодозовое облучение вызывает разнонаправленные изменения содержания митохондриальных цитохромов. Одним из механизмов снижения содержания митохондриальных гемсодержащих цитохромов может быть установленное нами нарушение их образования в связи с торможением активности ключевого фермента синтеза гема – 5-аминолевулинатсинтазы. Установленные изменения количественного содержания митохондриальных цитохромов сопровождаются торможением активности ключевого фермента цитохромного участка дыхательной цепи – цитохромоксидазы. При этом предварительное облучение опухоленосителей приводит к усиленному снижению цитохромоксидазной активности во все периоды эксперимента.

Ключевые слова: цитохромы *a*, *b*, *c*, 5-аминолевулинатсинтаза, цитохромоксидаза, карцинома Герена, малые дозы радиации

ВВЕДЕНИЕ. Ключевым фактором патогенеза многих заболеваний, в том числе онкологических, является прогрессирующая дисфункция митохондрий [1, 2]. Развитие злокачественных новообразований сопровождается нарушением энергетического обмена, а именно преобладанием гликолитического энергообеспечения, менее эффективного в сравнении с окислительным фосфорилированием [3]. В тоже время, последовательность биохимических реакций, определяющих развитие и реализацию дисфункции митохондрий опухолевых клеток в динамике онкогенеза, остается открытым вопросом и требует подробного изучения. В литературе нет систематизированных данных относительно состояния цитохромного участка дыхательной цепи опухоленосителей в условиях низкодозового облучения, в том числе активности цитохромоксидазы (КФ 1.9.3.1) и перераспределения гемсодержащих протеинов электронтранспортной цепи – цитохромов. Учитывая, что ключевым ферментом биосинтеза гема в митохондриях является фермент 5-аминолевулинатсинтаза (КФ 2.3.1.37) [4], а значительная часть синтезированного *de novo* гема утилизируется для синтеза именно митохондриальных цитохромов, целью нашей работы было исследование количественного перераспределения

* - адресат для переписки

ЦИТОХРОМЫ ДЫХАТЕЛЬНОЙ ЦЕПИ КАРЦИНОМЫ ГЕРЕНА

цитохромов *b*, *c* и *a*, цитохромоксидазной и 5-аминолевулинатсинтазной активности в митохондриальной фракции злокачественно трансформированной ткани крыс с трансплантированной карциномой Герена в динамике опухолевого роста и в условиях предварительного облучения малыми дозами радиации.

МЕТОДИКА. Исследования проводили на 190 белых нелинейных крысах-самках массой 110-130 г и возрастом 2,5-3 месяца, которые содержались на стандартном рационе вивария. Работу с животными проводили с учётом положений “Общих этических принципов экспериментов на животных”, принятых Первым Национальным конгрессом по биоэтике (г. Киев, 2001).

Животные были разделены на следующие группы: I – крысы с трансплантированной карциномой Герена (Пх), II – облучённые крысы, которым в 1-е сутки после окончания облучения трансплантировали карциному Герена (Р+Пх).

Трансплантацию карциномы Герена проводили путём подкожного введения 0,5 мл 30% суспензии раковых клеток в изотоническом растворе натрия хлорида. Штамм опухоли предоставлен Институтом экспериментальной патологии, онкологии и радиобиологии им. Р.Е. Кавецкого НАН Украины (г. Киев).

Облучение проводили ежедневно, через 24 ч, на протяжении семи суток в дозе $36,12 \cdot 10^{-4}$ Кл/кг (13 сГ) на рентгеновской диагностической установке 12П6 (“Lachema”, Чехия) при мощности дозы $2,58 \cdot 10^{-4}$ Кл/кг (0,93 сГр/с), напряжении 80 кВ, силе тока 40 мА, кожно-фокусном расстоянии 40 см с использованием фильтров 0,5 мм Cu [5].

Длительность эксперимента составляла 21 сутки. Эвтаназию под лёгким эфирным наркозом с использованием метода цервикальной дислокации проводили на 7 (латентная стадия), 14 (логарифмическая стадия), 21 (терминальная стадия опухолевого роста) сутки после имплантации опухоли.

Выделение митохондриальной фракции из гомогената опухолевой ткани проводили стандартным методом дифференциального центрифугирования [6]. Все операции проводили при 0-3°C.

Количественное определение митохондриальных цитохромов проводили с использованием метода дифференциальной спектрофотометрии [7].

5-Аминолевулинатсинтазную активность определяли спектрофотометрическим методом [8], ферментативную активность вычисляли с учётом коэффициента молярной экстинкции, равного для 5-аминолевулинатсинтазы $0,023 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ см}^{-1}$ и выражали в нмоль/мин на мг белка. Содержание белка определяли по Лоури [9].

Цитохромоксидазную активность определяли с помощью метода, в основе которого лежит способность цитохромоксидазы окислять диметилпарафенилдиамин и α -нафтол (реактив НАДИ) с образованием окрашенного продукта – индофенолового голубого [10].

Статистический анализ данных проводили с использованием *t*-критерия Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ. Результаты проведенных исследований показали, что в динамике опухолевого роста ткани карциномы Герена наблюдается тенденция к снижению содержания митохондриальных цитохромов *a*, *b* и *c*. Так, содержание цитохрома *b* в митохондриальной фракции карциномы Герена в период активного опухолевого роста снижается в 1,3 раза по сравнению с показателями латентной стадии онкогенеза с сохранением установленной тенденции на 21 сутки эксперимента (рис. 1.). В тоже время, на логарифмической стадии роста, наблюдается аналогичное цитохрому *b* снижение содержания цитохрома *a* в митохондриальной фракции карциномы Герена, но, в отличие от цитохрома *b*, на терминальных стадиях онкогенеза наблюдается тенденция к усилению снижения содержания цитохрома *a*. В указанный период содержание цитохрома *a* в 1,8 раза ниже показателей, зарегистрированных на 14 сутки роста карциномы Герена и в 2,2 раза ниже по сравнению с показателями латентной стадии (рис. 2).

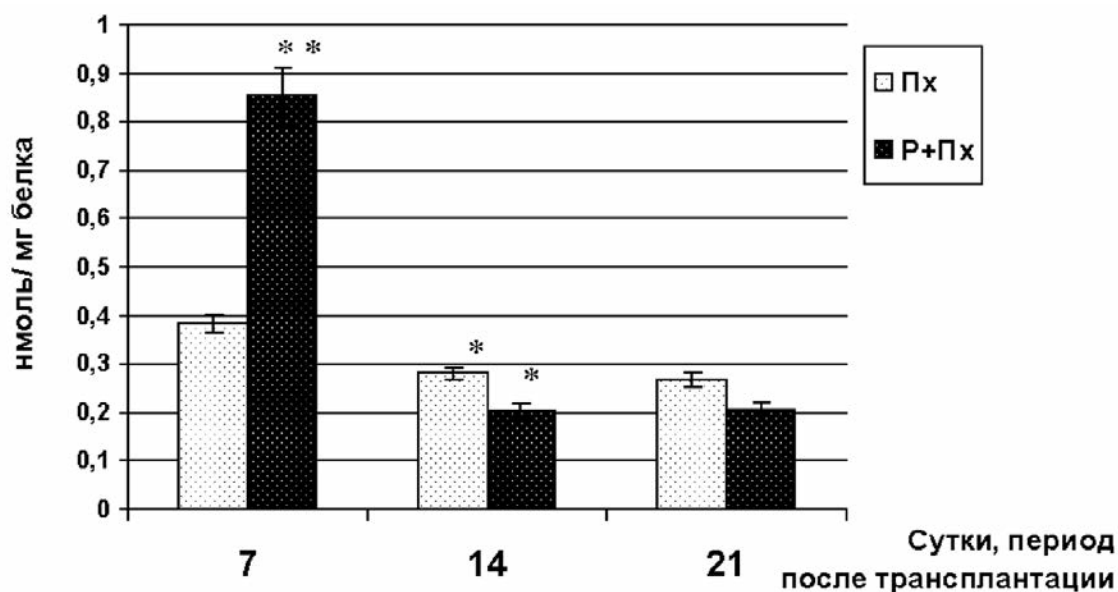


Рисунок 1.

Содержание цитохрома *b* в митохондриальной фракции карциномы Герена в динамике роста этой опухоли и в условиях облучения опухоленосителей малыми дозами радиации.

Здесь и далее: * - достоверная разница в сравнении с предыдущей стадией эксперимента;

** - достоверная разница в сравнении с необлучёнными опухоленосителями.

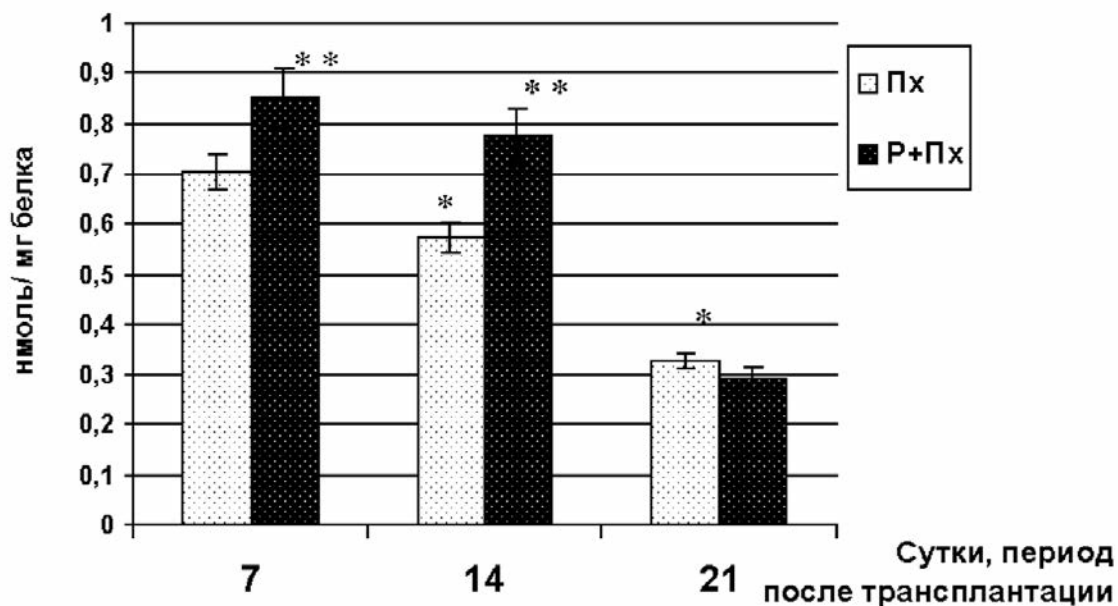


Рисунок 2.

Содержание цитохрома *a* в митохондриальной фракции карциномы Герена в динамике роста этой опухоли и в условиях облучения опухоленосителей малыми дозами радиации.

В условиях предварительного низкодозового облучения опухоленосителей только на начальных этапах онкогенеза наблюдается повышение содержания как цитохрома *b*, так и цитохрома *a* по сравнению с показателями необлучённых опухоленосителей (рис. 1, 2). На последующих этапах роста карциномы Герена наблюдается тенденция к снижению содержания исследуемых цитохромов, с приближением показателей к значениям у необлучённых опухоленосителей.

ЦИТОХРОМЫ ДЫХАТЕЛЬНОЙ ЦЕПИ КАРЦИНОМЫ ГЕРЕНА

В тоже время, в динамике опухолевого роста наблюдается тенденция к поэтапному снижению содержания цитохрома с с максимумом на 21 сутки эксперимента (рис. 3). В условиях облучения малыми дозами радиации уже на латентной стадии онкогенеза наблюдается резкое снижение содержания цитохрома с в митохондриальной фракции карциномы по сравнению с показателями необлученных животных, с сохранением установленных значений и на последующих этапах исследований.

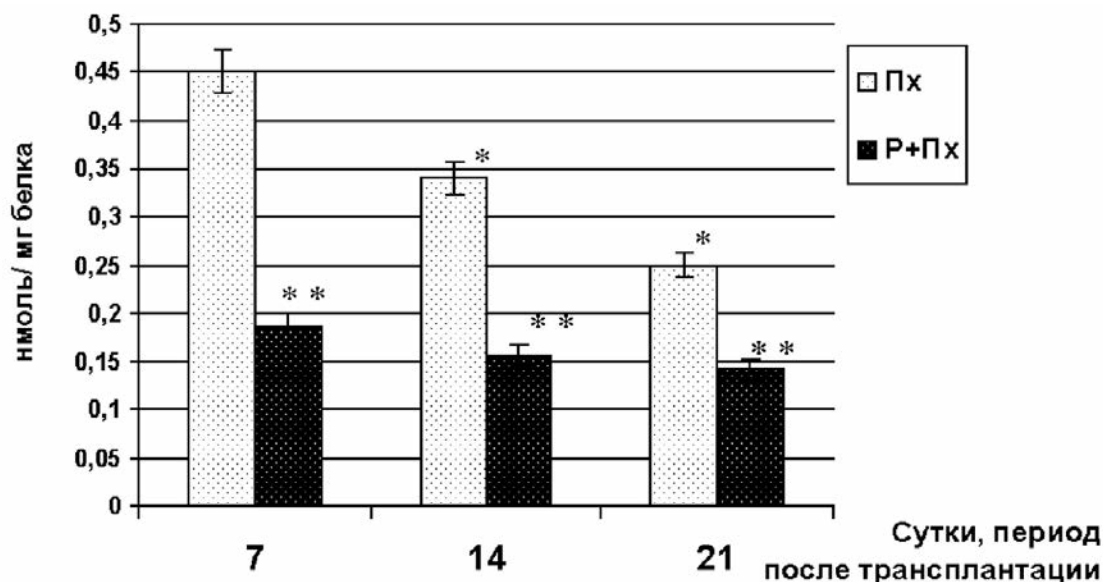


Рисунок 3.

Содержание цитохрома с в митохондриальной фракции карциномы Герена в динамике роста этой опухоли и в условиях облучения опухоленосителей малыми дозами радиации.

Известно, что цитохромы - гемсодержащие протеины, количество которых в клетке зависит от интенсивности синтеза гема [11]. Ключевым в процессах биосинтеза гема является фермент 5-аминолевулинатсинтаза [4]. Этот факт побудил нас к изучению ферментативной активности 5-аминолевулинатсинтазы в митохондриальной фракции опухолевой ткани предварительно облучённых крыс-опухоленосителей.

Результаты проведенных исследований показали, что достоверное снижение активности 5-аминолевулинатсинтазы в митохондриальной фракции карциномы Герена наблюдается на 21 сутки опухолевого роста, и в указанный период эксперимента исследуемая активность в 1,8 раза ниже показателей, зарегистрированных на логарифмической стадии онкогенеза. Установленное снижение 5-аминолевулинатсинтазной активности на терминальных этапах онкогенеза сопровождается, как было отмечено, максимальным снижением содержания митохондриальных цитохромов в ткани опухоли.

В тоже время, предварительное низкодозовое облучение на латентной стадии роста опухоли вызывает торможение в 4,4 раза ферментативной активности 5-аминолевулинат-синтазы в митохондриальной фракции карциномы Герена в группе облучённых опухоленосителей, по сравнению с необлучёнными животными с этой опухолью (рис. 4). На последующих этапах опухолегенеза наблюдается тенденция к повышению ферментативной активности 5-аминолевулинатсинтазы, и на 21 сутки роста неоплазмы активность 5-аминолевулинатсинтазы в исследуемых группах животных достоверно не отличается. Установленный факт можно объяснить тем, что при нарушении

клеточного дыхания, как и при недостатке АТФ в клетке, 5-аминолевулинатсинтазная активность быстро повышается за счет активации транскрипции при участии NRF-1 (nuclear respiratory factor-1) [11], а также за счет стимуляции переноса предшественника 5-аминолевулинатсинтазы из цитоплазмы в митохондрии.

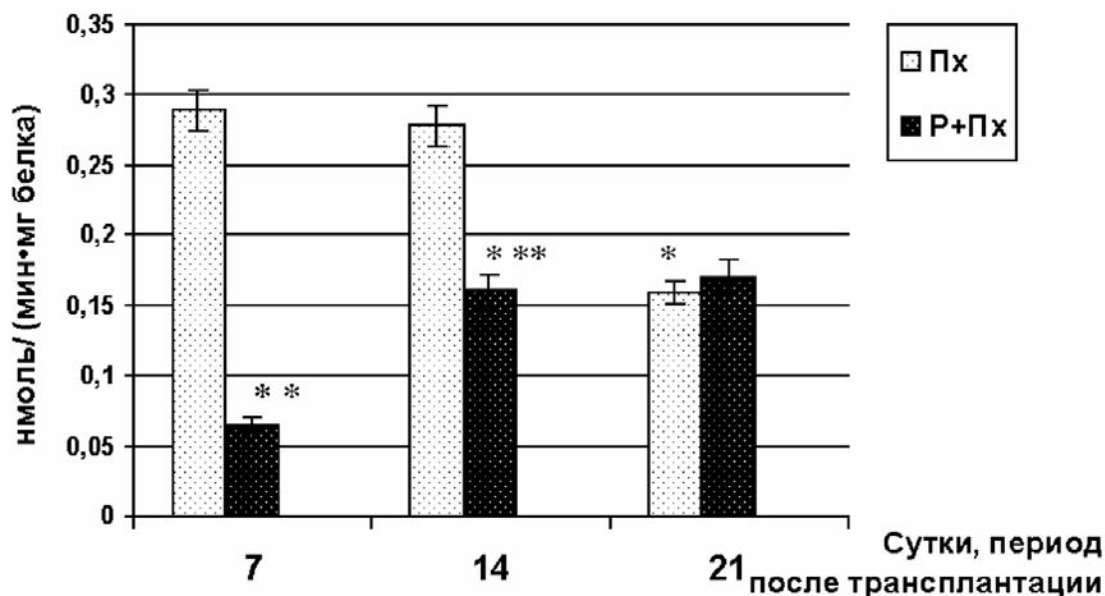


Рисунок 4.

Активность 5-аминолевулинатсинтазы в митохондриальной фракции карциномы Герена в динамике роста этой опухоли и в условиях облучения опухоленосителей малыми дозами радиации.

Итак, в динамике роста карциномы Герена наблюдается снижение содержания митохондриальных цитохромов *a*, *b*, *c*, с максимумом снижения на терминальных этапах опухолевого роста. Одним из механизмов снижения содержания цитохромов *b*, *c*, *a* в динамике роста карциномы Герена и в условиях низкодозового облучения может быть установленное нами нарушение их образования в связи с торможением синтеза гема.

Цитохромы являются важными компонентами дыхательной цепи митохондрий. Ключевым ферментом цитохромного участка дыхательной цепи является фермент цитохромоксидаза [12, 13], обеспечивающий передачу электронов в процессе окислительного фосфорилирования от цитохрома *c* на молекулярный кислород, и содержащий два гема цитохрома *a*.

Результаты наших исследований показали, что в динамике опухолевого роста наблюдается тенденция к торможению цитохромоксидазной активности (рис. 5). Так, на стадии активного роста карциномы Герена цитохромоксидазная активность снижается в три раза по сравнению с латентной стадией онкогенеза. Последующий рост опухоли сопровождается прогрессирующим снижением цитохромоксидазной активности по сравнению с начальными этапами эксперимента. Одной из вероятных причин установленного факта может быть нарушение стехиометрии субъединиц фермента, поскольку в опухолевых клетках наблюдается усиление экспрессии субъединиц цитохромоксидазы ядерного кодирования на фоне нарушения синтеза субъединиц митохондриального кодирования [14], что, в свою очередь, может рассматриваться как следствие усиленной фрагментации мтДНК карциномы Герена [15]. Учитывая, что именно с субъединицами митохондриального кодирования связан цитохром *a*, снижение цитохромоксидазной активности на фоне снижения содержания цитохрома *a* выглядит вполне логическим.

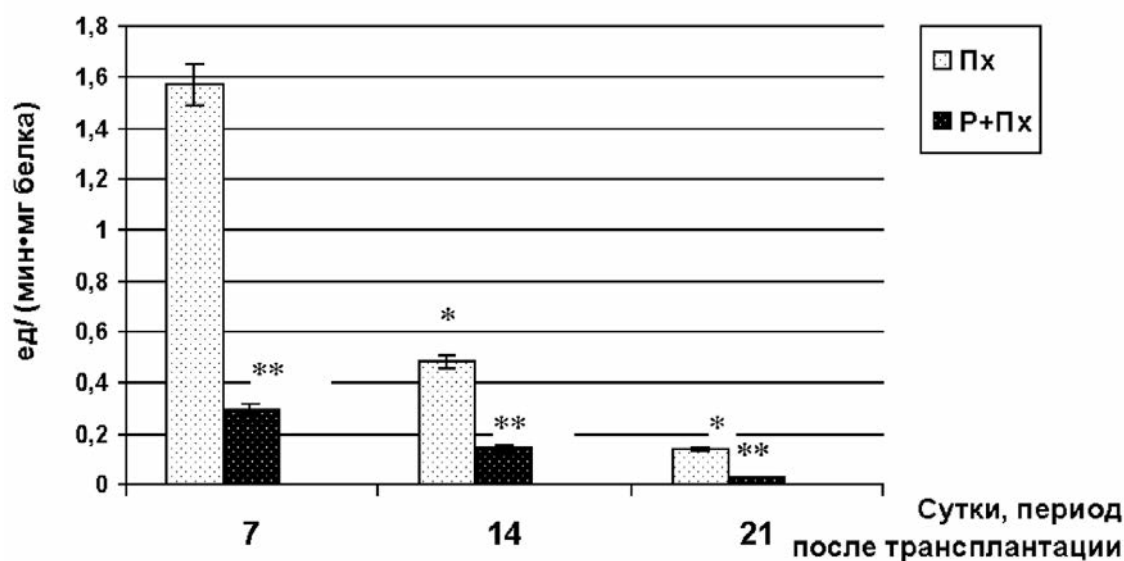


Рисунок 5.

Цитохромоксидазная активность в митохондриальной фракции карциномы Герена в динамике роста этой опухоли и в условиях облучения опухоленосителей малыми дозами радиации.

Установленные изменения состояния цитохромного участка дыхательной цепи можно рассматривать как один из дополнительных механизмов нарушения энергообеспечения опухолевых клеток.

Предварительное низкодозовое облучение опухоленосителей сопровождается торможением цитохромоксидазной активности на всех этапах онкогенеза. Так, на латентной стадии роста карциномы Герена цитохромоксидазная активность в 5,3 раза ниже по сравнению с необлученными опухоленосителями, в тоже время, на стадии активного роста карциномы цитохромоксидазная активность в 2 раза ниже по сравнению с предварительной стадией эксперимента, и в 3,3 раза ниже по сравнению с необлученными опухоленосителями, с сохранением установленной тенденции и на терминальных стадиях роста карциномы Герена.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ И ВЫВОДЫ. Таким образом, на начальных стадиях онкогенеза низкодозовое облучение вызывает повышение содержания цитохромов *a* и *b* на фоне снижения содержания цитохрома *c*, однако в динамике онкогенеза в группах облученных и необлученных опухоленосителей наблюдается снижение содержания митохондриальных цитохромов *a*, *b* и *c* с максимумом на терминальной стадии роста карциномы Герена. Установленные изменения количественного содержания митохондриальных цитохромов сопровождаются торможением активности ключевого фермента цитохромного участка дыхательной цепи – цитохромоксидазы, при этом предварительное облучение опухоленосителей приводит к усиленному снижению цитохромоксидазной активности во все экспериментальные периоды.

Одним из механизмов снижения содержания митохондриальных гемсодержащих цитохромов может быть установленное нами нарушение их образования в связи с торможением активности ключевого фермента синтеза гема – 5-аминолевулинатсинтазы.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Меньщикова Е.Б., Шабалина И.Г., Зенков Н.К., Колосова Н.Г.* (2002) Бюлл. эксперим. биол. мед., **2**, 207-210.
2. *Maximo V., Lima J., Soares P., Sobrinho-Simaes M.* (2009) *Virchows Arch.*, **454**, 481-495.
3. *Мишуніна Т.М.* (2009) Журн. АМН України, **15**(3), 417-448.
4. *Yoshino K., Munakata H., Kuge O., Ito A., Ogishima T.* (2007) *Biochem.*, **142**(4), 453-458.
5. *Марченко М.М., Копильчук Г.П., Кеца О.В.* (2010) Биомед. химия, **56**(2), 266-273.
6. *Frezza C., Cipolat S., Scorrano L.* (2007) *Nature Protocols*, **2**, 287-295.
7. *Евтюдиенко Ю.В., Мохова Е.Н.* (1967) в кн.: Механизмы дыхания, фотосинтеза и фиксации азота. Количественное определение соотношений цитохромов в митохондриях. Наука, Москва, сс. 35-48.
8. *Collins A., Marver H., Tschudy P.* (1966) *J. Biol. Chem.*, **241**, 4323-4329.
9. *Lowry O.H., Rosebrough M.J., Farr A.L., Randal R.J.* (1951) *J. Biol. Chem.*, **193**, 265-275.
10. *Кузьмичева Л.В., Романова Е.В., Матюшкин А.П.* (2007) Фундаментальные исследования, **12**, 86-88.
11. *Калиман П.А., Иншина Н.Н.* (2003) Укр. біохім. журн., **75**(2), 99-102.
12. *Кузнецова С.С., Ацаркина Н.В., Выгодина Т.В., Силецкий С.А., Константинов А.А.* (2005) Биохимия, **70**, 160-169.
13. *Романова Т.А., Аврамов П.В.* (2005) Журн. структурной химии, **46**(2), 351-354.
14. *Krieg R., Knuechel R., Schiffmann E.* (2004) *Proteomics*, **4**, 2789-2795.
15. *Марченко М.М., Копильчук Г.П., Волощук О.М.* (2008) Укр. біохім. журн., **80**(4), 114-119.

Поступила: 15. 11. 2011.

THE CHANGE IN THE STRUCTURAL AND FUNCTIONAL ORGANIZATION OF THE GUERIN'S CARCINOMA CYTOCHROME PART OF RESPIRATORY CHAIN IN TUMOR CARRIERS IN THE CONDITIONS OF PRELIMINARY LOW-LEVEL IRRADIATION

O.N. Voloshchuk, M.M. Marchenko, M.C. Mudrak

Fedkovych Chernovtsi National University, ul. M. Cotsubinskogo, 2, Chernovtsi, 58000 Ukraine;
tel.: (0373) 58-48-38; e-mail: oxbm@mail.ru

The effect of low-level irradiation of tumor-bearing rats on the structural and functional organization of the cytochrome part of respiratory chain of mitochondria isolated from Guerin's carcinoma has been investigated.

The maximal reduction in the mitochondrial cytochromes *a*, *b* and *c* content was observed at the terminal stage of Guerin's carcinoma. A low-level irradiation during initial stages of oncogenesis produced opposite changes in the mitochondrial cytochrome content.

The possible mechanism of mitochondrial haem-containing cytochromes content reduction may be attributed to impairment in their formation caused by inhibition of the key enzyme of haem synthesis, 5-aminolevulinate synthase.

The determined changes of the mitochondrial cytochromes quantitative content were accompanied by decreased activity of cytochrome oxidase. The preliminary low-level irradiation of the tumor-bearing animals produced further reduction in the cytochrome oxidase activity observed in all experimental periods.

Key words: cytochromes *a*, *b*, *c*, 5-aminolevulinate synthase, cytochrome oxydase, Guerin's carcinoma, low-level irradiation.