

УДК 577.112+616-006.6

©Марченко, Кеца

ФУНКЦИОНИРОВАНИЕ NADH-ЗАВИСИМОЙ РЕДУКТАЗНОЙ СИСТЕМЫ МИКРОСОМНОЙ ФРАКЦИИ ПЕЧЕНИ И КАРЦИНОМЫ ГЕРЕНА ПРЕДВАРИТЕЛЬНО ОБЛУЧЕННЫХ КРЫС

*М.М. Марченко, 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

В работе проведено исследование ферментативной активности NADH-цитохром b_5 редуктазы, содержания и скорости восстановления-окисления цитохрома b_5 в микросомной фракции печени и карциномы Герена предварительно облученных крыс-опухоленосителей. Показано, что облучение организма, предшествующее трансплантации опухоли, приводит к снижению как ферментативной активности NADH-цитохром b_5 редуктазы, так и содержания цитохрома b_5 в микросомной фракции карциномы Герена в латентную и логарифмическую фазы онкогенеза в сравнении с необлученными опухоленосителями.

Установлено, что ферментативная активность NADH-цитохром b_5 редуктазы в микросомной фракции печени облученных крыс в условиях роста в организме карциномы Герена повышается в латентную и логарифмическую фазы онкогенеза. В то же время, снижается содержание цитохрома b_5 с одновременным повышением скорости его восстановления-окисления в микросомной фракции печени облученных крыс-опухоленосителей.

Ключевые слова: NADH-цитохром b_5 редуктаза, цитохром b_5 , микросомная фракция, печень, карцинома Герена.

ВВЕДЕНИЕ. Процессы гидроксирования ксенобиотиков разными изоформами цитохрома P450 в значительной степени зависят от NADH-зависимой цепи эндоплазматического ретикулума (ЭР), участвующего в перенесении электронов с восстановленного NADH через флавиносодержащий фермент NADH-цитохром b_5 редуктазу на цитохром b_5 [1]. Цитохром b_5 , в свою очередь, переносит электроны на цитохром P450 (CYP) на пятом этапе монооксигеназного цикла. При этом оксикомплекс CYP с субстратом – $(\text{RH})\text{Fe}^{3+}(\text{O}_2^-)$ превращается в пероксикомплекс $(\text{RH})\text{Fe}^{3+}(\text{O}_2^{2-})$, что имеет большое значение в метаболизме ксенобиотиков, в том числе лекарственных препаратов [2, 3].

Нарушение структурно функциональных особенностей NADH-зависимой цепи ЭР может привести к изменениям функционирования монооксигеназной системы в целом. Развитие в организме патологических процессов, в том числе онкологических, или влияние на организм разных факторов окружающей

* - адресат для переписки

среды могут быть причиной изменений ферментативной активности NADH-цитохром b_5 редуктазы, цитохрома b_5 и, как следствие, цитохрома P450 [4]. Изучение каталитических свойств NADH-специфического флавопротеина и цитохрома b_5 в условиях роста в организме злокачественного новообразования имеет большое значение для понимания нарушения транспорта электронов на СУР и процессов гидроксилирования ксенобиотиков разными изоформами СУР в печени.

Целью данной работы явилось изучение особенностей функционирования компонентов NADH-зависимой редокс-цепи в микросомной фракции печени и карциномы Герена предварительно облученных крыс.

МЕТОДИКА. В работе использовались самки белых беспородных крыс массой 130-150 г. Облучение животных осуществляли в течение 7-ми суток ежедневно в экспозиционной дозе $36,12 \times 10^{-4}$ Кл/кг на аппарате 12П6 ("Lachema", Чехия) при таких условиях: напряжение 80 кВ, сила тока 40 мА, фильтры 0,5 мм Cu, кожно-фокусное расстояние 40 см, мощность дозы $2,58 \times 10^{-4}$ Кл/кг. Суммарная доза облучения 25,3 мКл/кг. По окончании облучения животным трансплантировали опухоль. В качестве модели злокачественного новообразования использовали карциному Герена. Трансплантацию карциномы осуществляли путём подкожного введения в участок бедра 0,5 мл 30% суспензии раковых клеток в физиологическом растворе.

Животных разделили на 4 группы: I – интактные животные (контроль) (30 крыс); II – облучённые крысы (28 животных); III – 24 крысы с трансплантированной карциномой Герена; IV – 24 крысы с карциномой Герена, трансплантированной на фоне предварительного облучения в малых дозах.

Эвтаназию животных осуществляли под легким 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.

Микросомную фракцию получали из печени и карциномы Герена крыс методом дифференциального центрифугирования [5]. Принцип метода основывается на том, что микросомы – высокозаряженные частицы, способны образовывать агрегаты с ионами двухвалентных металлов, нейтрализующих негативный заряд микросом. Выделение микросом проводили, центрифугируя пробы 15 мин при 9000 g.

В суспензии микросомной фракции определяли NADH-цитохром b_5 редуктазную активность и содержание цитохрома b_5 [6] в перерасчёте на 1 мг белка. Содержание белка в пробах определяли методом Лоури [7].

Скорость восстановления-окисления цитохрома b_5 регистрировали по дифференциальным спектрам поглощения [6]. Запись дифференциального спектра цитохрома b_5 повторяли через каждые 30 с при длинах волн 424 и 475 нм ($\Delta A_{424-475}$). Полученные данные обрабатывали статистически по Стьюденту.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ. Функционирование NADH-зависимой электрон-транспортной цепи ЭР в первую очередь зависит от активности первого компонента редокс-цепи – NADH-цитохром b_5 редуктазы. NADH-цитохром b_5 -редуктаза передает электроны с NADH на цитохром b_5 [8].

Результаты исследований энзиматической активности флавопротеина в опухолевой ткани показали, что наивысший уровень NADH-цитохром b_5 редуктазной активности наблюдается в период интенсивного роста карциномы Герена с постепенным снижением на терминальную фазу онкогенеза (рис. 1). Повышение NADH-цитохром b_5 редуктазной активности может способствовать увеличению потока электронов с восстановленного NADH на цитохром b_5 [9].

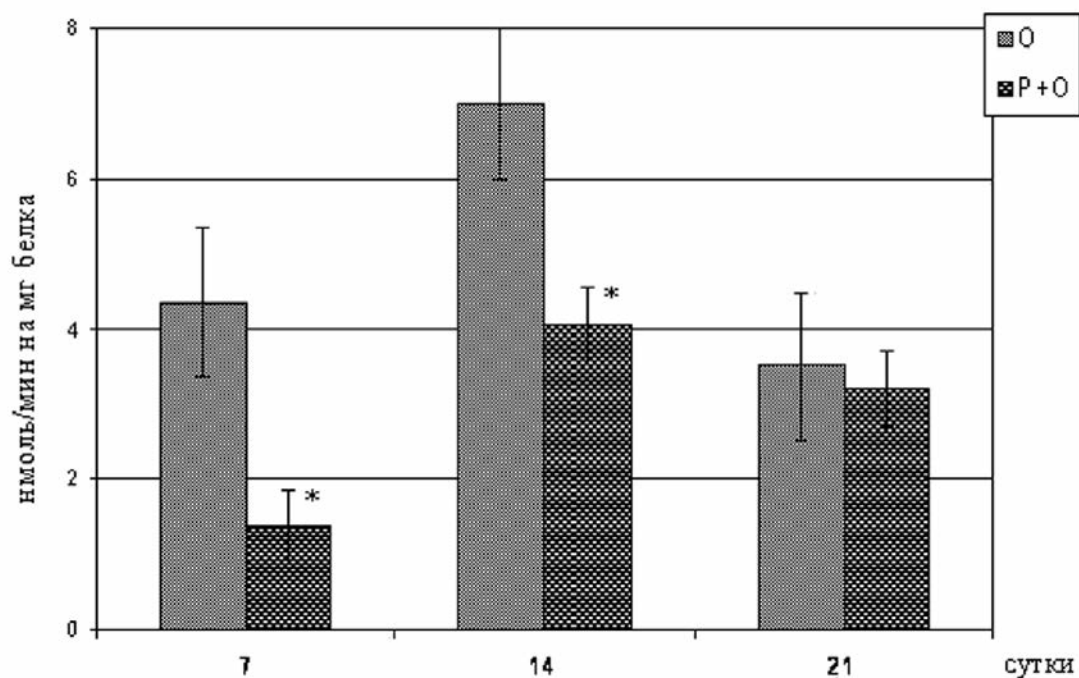


Рисунок 1.

NADH-цитохром b_5 редуктазная активность в микросомной фракции карциномы Герена предварительно облученных крыс-опухоленосителей.

O - животные, которым трансплантировали опухолевые клетки; P+O - животные, которым по окончании 7-ми суточного облучения трансплантировали опухолевые клетки;

* - статистически достоверная разница в сравнении с показателем необлученных крыс-опухоленосителей ($p \leq 0,05$).

Влияние предварительного перед трансплантацией карциномы Герена облучения приводит к снижению ферментативной активности NADH-цитохром b_5 редуктазы в латентную и логарифмическую фазы онкогенеза в 3,2 и 1,7 раза соответственно, что может быть связано с нарушением липидного окружения энзима или со снижением пула восстановленного NADH в опухолевых клетках [10]. Стационарная фаза онкогенеза характеризуется приближением исследуемого показателя к показателям группы необлученных опухоленосителей (рис. 1).

Непосредственным компонентом, передающим электроны на цитохром P450 в микросомной NADH-зависимой электрон-транспортной цепи, является цитохром b_5 .

Анализ результатов исследования показал, что у необлученных крыс по мере роста в организме карциномы Герена содержание мембраносвязанного цитохрома b_5 микросомной фракции опухолевой ткани постепенно снижается с минимальными значениями на терминальной стадии онкогенеза (21-е сутки после трансплантации карциномы Герена) (рис. 2). Установленный факт может быть следствием интенсификации процессов перекисного окисления липидов (ПОЛ) в микросомной фракции [11] со следующей деградацией мембранного цитохрома b_5 эндоплазматического ретикулула.

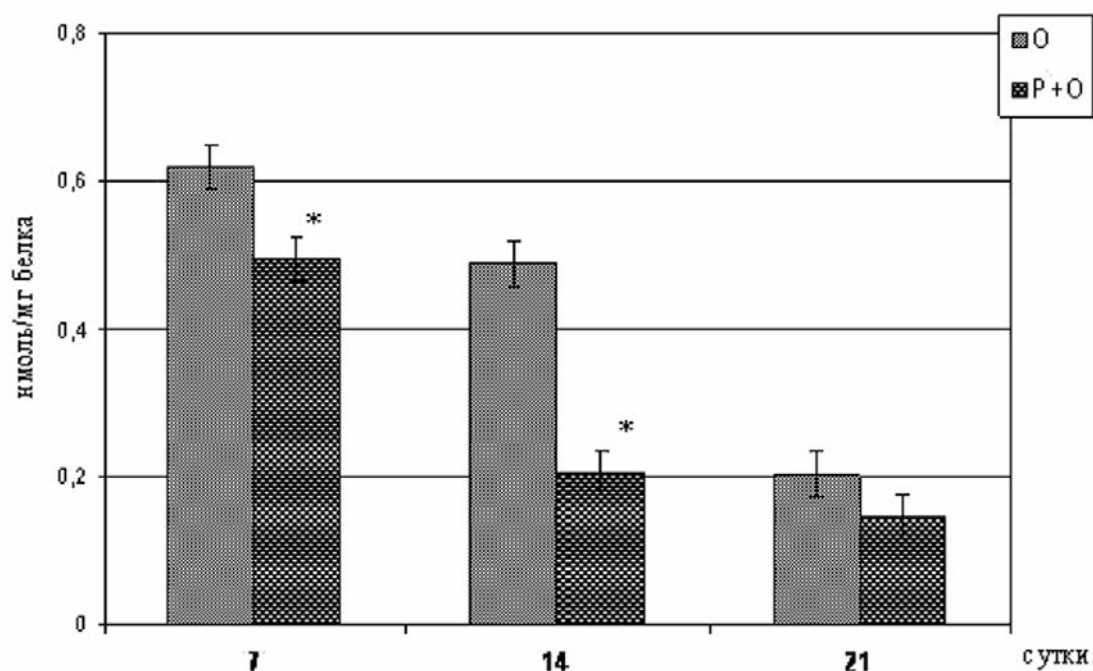


Рисунок 2.

Содержание цитохрома b_5 в микросомной фракции карциномы Герена предварительно облучённых крыс-опухоленосителей.

О - животные, которым трансплантировали опухолевые клетки; P+O - животные, которым по окончании 7-ми суточного облучения трансплантировали опухолевые клетки;

* - статистически достоверная разница в сравнении с показателем необлучённых крыс-опухоленосителей ($p \leq 0,05$).

В микросомной фракции карциномы Герена предварительно облученных крыс наблюдается снижение содержания цитохрома b_5 в период начального и интенсивного роста опухоли в сравнении с необлученными опухоленосителями (рис. 2). Наиболее существенное снижение наблюдается в период интенсивного роста опухоли, когда содержание цитохрома b_5 в 2,4 раза ниже показателей группы необлученных опухоленосителей. Предыдущими исследованиями показано [11], что в аналогичных условиях в микросомной фракции карциномы Герена повышается гидроксилазная активность цитохрома P450 – основного акцептора электронов, поступающих от цитохрома b_5 .

Вероятно, цитохром b_5 проявляет защитное действие на молекулы терминальной оксигеназы, поскольку окисляется активными формами кислорода, образующимися при действии облучения. В данном случае передача электронов на CYP в монооксигеназном цикле может осуществляться от NADPH-цитохром P450 редуктазы, что предупреждает нарушение функционирования цитохром P450-зависимой монооксигеназной системы, интенсифицируя, тем самым, процессы онкогенеза [12]. С другой стороны, снижение содержания цитохрома b_5 может компенсироваться скоростью его восстановления-окисления при передаче электронов в монооксигеназной системе.

Результаты проведенных исследований показали, что предварительное перед трансплантацией карциномы Герена облучение способствует повышению скорости восстановления-окисления цитохрома b_5 в микросомной фракции карциномы Герена в период начального и интенсивного роста опухоли в сравнении с необлученными опухоленосителями (рис. 3), что повышает вероятность передачи электронов цитохромом b_5 из цепи окисления NADH в цепь окисления NADPH, в частности на цитохром P450.

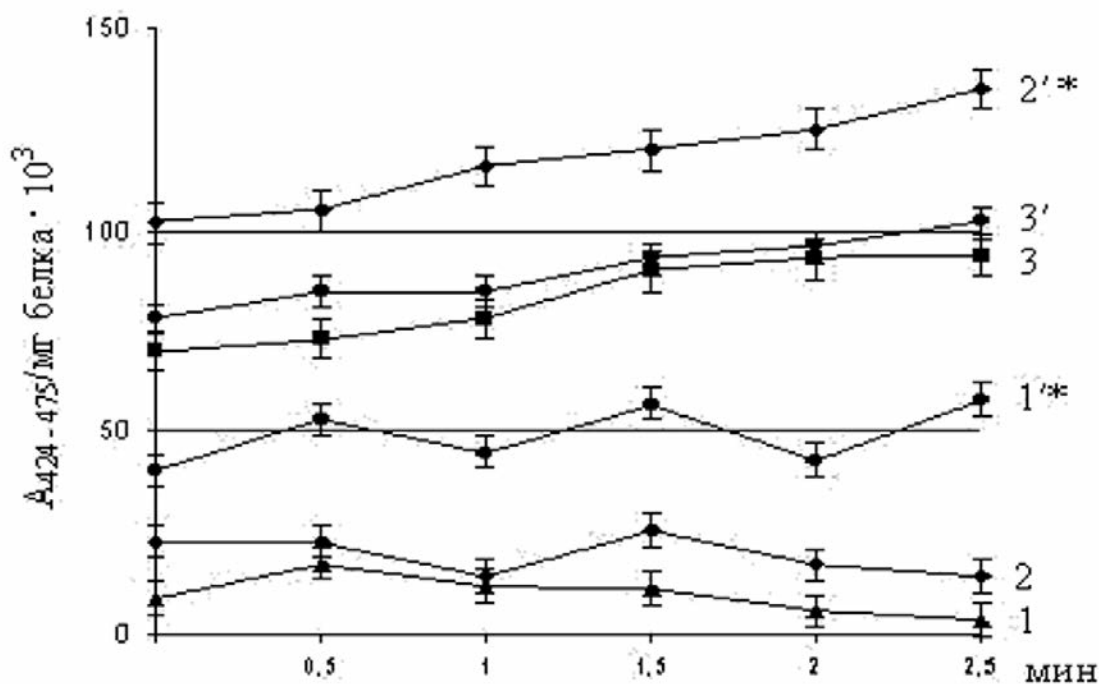


Рисунок 3.

Скорость восстановления-окисления цитохрома b_5 в микросомной фракции карциномы Герена предварительно облучённых крыс-опухоленосителей.

1, 2, 3 - крысы-опухоленосители на 7, 14, 21-е сутки после трансплантации опухоли соответственно; 1', 2', 3' - предварительно облученные крысы-опухоленосители на 7, 14, 21-е сутки после трансплантации опухоли соответственно; * - статистически достоверная разница в сравнении с показателем необлучённых крыс-опухоленосителей ($p \leq 0,05$).

Поскольку цитохром b_5 выступает в качестве редокс-партнера в реакциях, катализируемых разными изоформами цитохрома P450, то этот факт может иметь место в резистентности опухоли к противоопухолевым препаратам, метаболизирующихся цитохромом P450 и способствовать развитию карциномы Герена в организме.

Таким образом, в условиях предыдущего рентгеновского облучения в малых дозах в микросомной фракции карциномы Герена снижается содержание цитохрома b_5 , однако скорость его восстановления-окисления повышается в период интенсивного роста опухоли, что указывает на его роль в функционировании цитохром P450-зависимой цепи микросом.

Развитие новообразования в организме сопровождается снижением стойкости организма к действию повреждающих факторов. Важное значение

ВЛИЯНИЕ ОБЛУЧЕНИЯ КРЫС-ОПУХОЛЕНОСИТЕЛЕЙ НА СИСТЕМЫ МИКРОСОМ

в этих процессах играют изменения функций печени – основного гомеостатического органа в организме. Предыдущими исследованиями показано, что при росте в организме карциномы Герена происходит нарушение окислительно-восстановительных процессов в микросомной гидроксилазной цепи, что, вероятно, определяет нарушения функций данного органа [4].

Анализ полученных результатов показал, что действие на организм фракционированного рентгеновского облучения в малых дозах приводит к повышению ферментативной активности NADH-цитохром b_5 редуктазы и одновременному снижению содержания цитохрома b_5 на первые и седьмые сутки после снятия радиационного фактора. По мере отдаления от срока облучения – на 21-е сутки, действие малых доз радиации нивелируется и исследуемые показатели приближаются к значениям интактных животных (рис. 4, 5).

Исследования микросомной фракции печени крыс в условиях роста в организме карциномы Герена показали, что NADH-цитохром b_5 редуктазная активность в 1,3 раза превышает показатели интактных животных в период интенсивного роста карциномы Герена в организме (рис. 4). В то же время, в микросомной фракции печени наблюдается снижение содержания цитохрома b_5 (рис. 5).

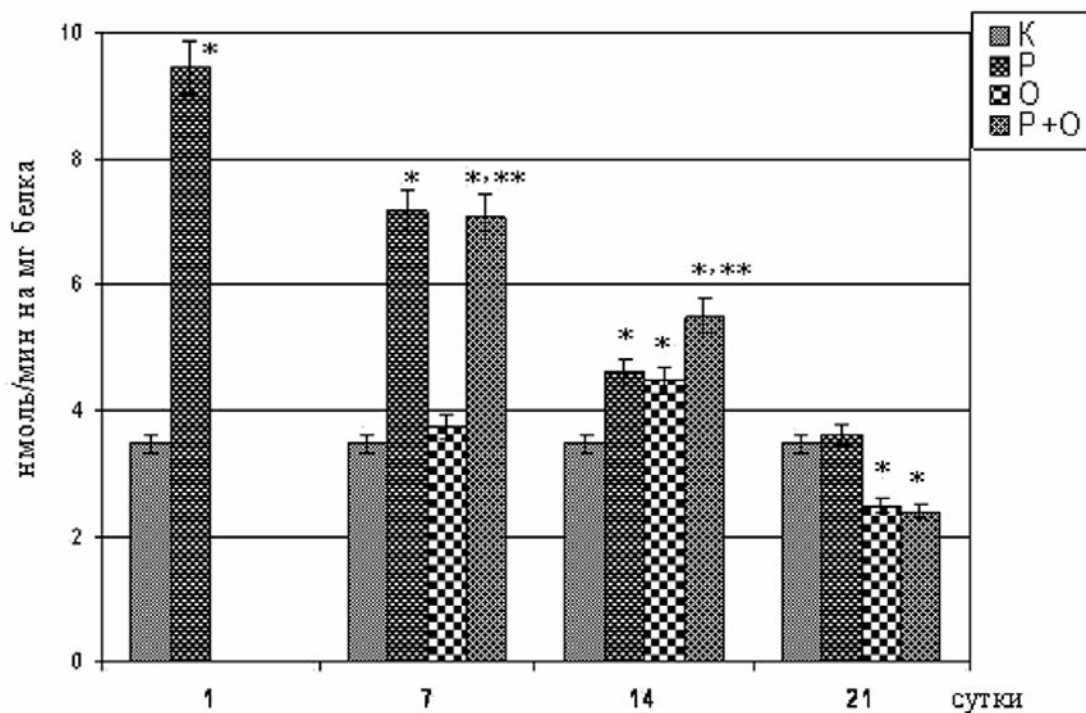


Рисунок 4.

NADH-цитохром b_5 редуктазная активность в микросомной фракции печени предварительно облучённых крыс-опухоленосителей.

К - интактные животные; Р - облучённые 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 ($p \leq 0,05$).

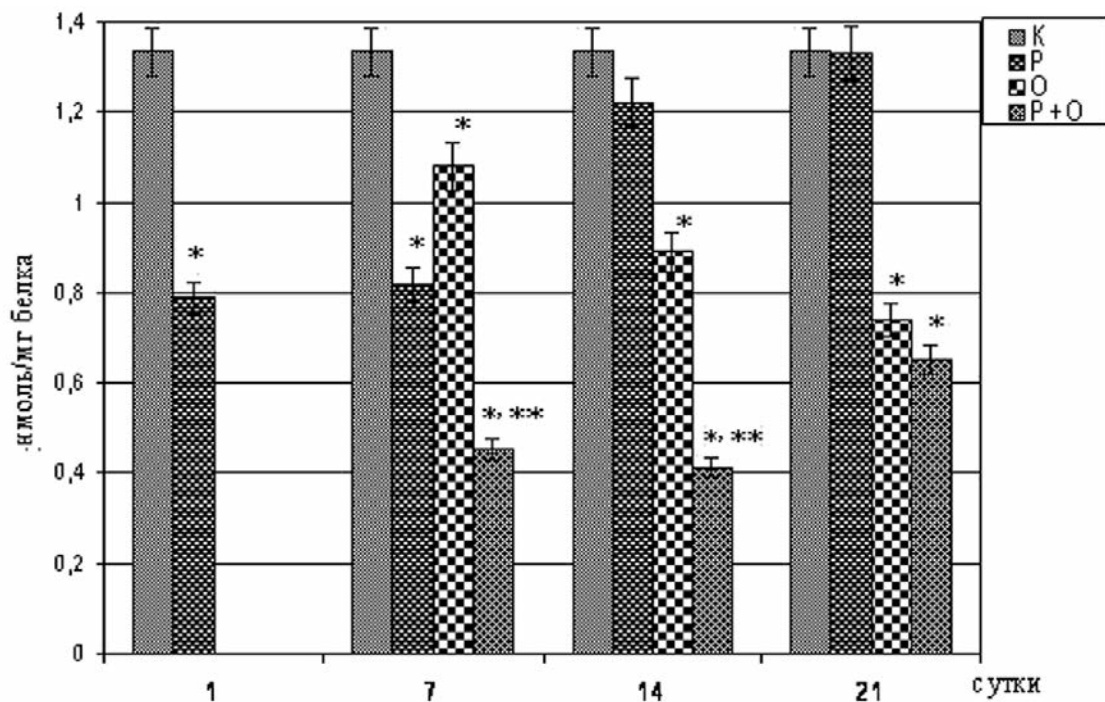


Рисунок 5.

Содержание цитохрома b_5 в микросомной фракции печени предварительно облучённых крыс-опухоленосителей

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 ($p \leq 0,05$).

Повышение NADH-цитохром b_5 редуктазной активности может иметь негативные последствия, поскольку в данном случае электроны могут передаваться не на цитохром b_5 , содержание которого снижено, а на молекулярный кислород, в результате чего образуются активные формы кислорода и происходит инициация свободно радикального окисления макромолекул в клетке [13].

На терминальном этапе роста карциномы Герена в организме наблюдается снижение ферментативной активности исследуемого энзима в сравнении с показателями характерными для интактных крыс. Снижение активности микросомной NADH-зависимой редуктазы может происходить в результате окисления энзима активными формами кислорода, что ограничивает скорость транспорта электронов на гидроксилазную редокс-цепь, в частности на CYP.

Предварительное перед трансплантацией карциномы Герена облучение приводит к повышению ферментативной активности NADH-цитохром b_5 редуктазы и снижению содержания цитохрома b_5 в микросомной фракции печени в сравнении с необлучёнными опухоленосителями. Так, максимальное значение NADH-цитохром b_5 редуктазной активности и минимальное значение содержания цитохрома b_5 наблюдаются на 7, 14 сутки роста опухоли в облученном организме (рис. 4, 5).

Повышение NADH-цитохром b_5 редуктазной активности может быть обусловлено участием данного фермента в генерации АФК в условиях облучения и роста карциномы Герена в организме. Снижение содержания цитохрома b_5 при действии радиации и росте опухоли, вероятно, предопределено образованием связей между аминокгруппами мембранных белков и вторичными продуктами ПОЛ, которые, связываясь с цитохромом b_5 , могут образовывать так называемые основания Шиффа, которым присуща высокая реакционная способность к созданию межмолекулярных "сшивок", а также участие в реакциях полимеризации и поликонденсации [14].

Таким образом, предварительное действие фракционированного рентгеновского облучения, перед трансплантацией карциномы Герена в организм, приводит к повышению NADH-цитохром b_5 редуктазной активности и снижению содержания цитохрома b_5 в микросомной фракции печени крыс на латентной и логарифмической фазах онкогенеза. На терминальной стадии онкогенеза значения исследуемых показателей приближаются к показателям характерным для группы необлучённых крыс-опухоленосителей.

Установленный факт может быть причиной снижения скорости метаболизма экзогенных и эндогенных токсинов цитохромом P450 в микросомах печени, за счёт снижения передачи электронов на CYP, что является предпосылкой для усиленного роста опухоли в предварительно облучённом организме [15].

Чтобы проверить данное предположение мы исследовали скорость восстановления-окисления цитохрома b_5 (рис. 6).

В группе облученных крыс после снятия радиационного фактора наивысшая скорость восстановления-окисления цитохрома b_5 наблюдается в первые сутки и сохраняется на высоком уровне на 7-е сутки эксперимента (рис. 6а). На 21-е сутки данный показатель приобретает значения контроля, что свидетельствует о нивелировании предыдущего действия облучения (рис. 6в).

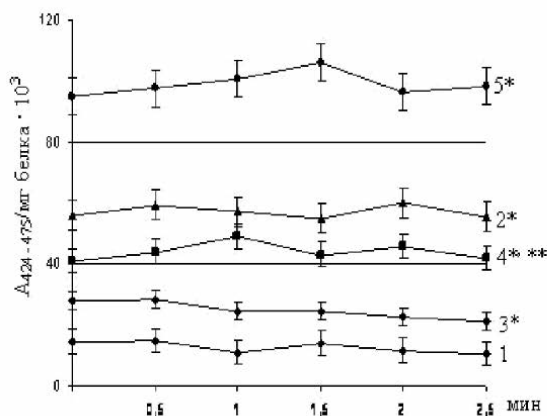
Исследование скорости восстановления-окисления цитохрома b_5 в микросомной фракции печени крыс в условиях онкогенеза показало, что по мере роста в организме карциномы Герена скорость присоединения и отдачи электронов цитохромом b_5 повышается.

Таким образом, со снижением содержания цитохрома b_5 в микросомной фракции печени крыс-опухоленосителей, его скорость принимать и отдавать электроны повышается.

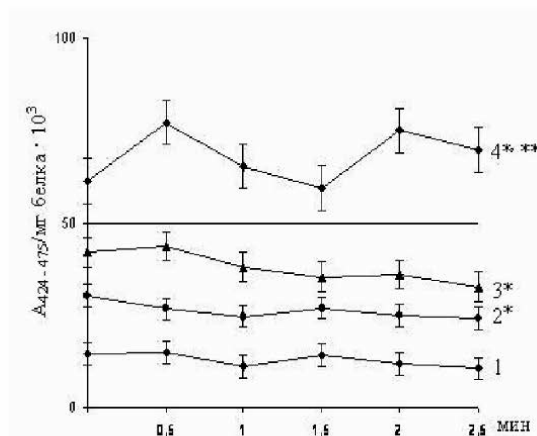
У предварительно облучённых опухоленосителей наблюдается повышение скорости восстановления-окисления цитохрома b_5 в микросомной фракции печени в сравнении с необлучёнными животными-опухоленосителями. Наибольшая разница между этими группами наблюдается в период интенсивного роста опухоли (рис. 6б). Так, скорость восстановления-окисления цитохрома b_5 в микросомной фракции печени облучённых крыс-опухоленосителей в 1,5 раза превышает соответствующий показатель группы необлучённых опухоленосителей. Установленный факт свидетельствует о том, что предварительное облучение способствует интенсификации передачи электронов цитохромом b_5 в редуктазной редокс-цепи микросом печени крыс-опухоленосителей. Установленный факт говорит о том, что может повышаться участие цитохрома b_5 в передаче электронов на цитохром P450 [13]. Однако, следует заметить, что в данный период гидроксилазная активность цитохрома P450 в микросомной фракции печени предварительно облучённых крыс-опухоленосителей

снижена [11]. Вероятно, электроны с редуцтазной редокс-цепи поступают не на оксигеназную цепь, а на молекулярный кислород, интенсифицируя, тем самым, свободно-радикальные процессы в печени крыс.

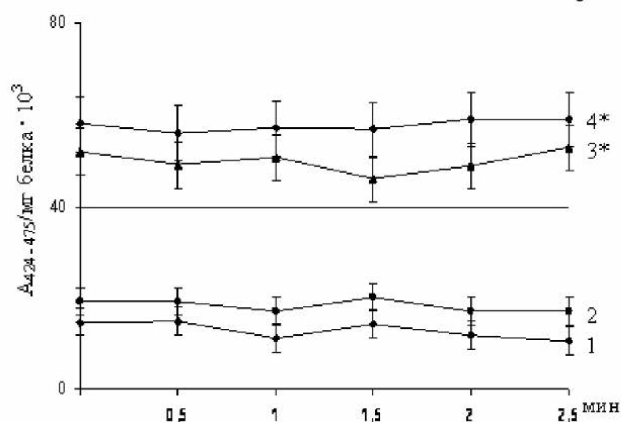
В стационарную фазу онкогенеза у облучённых крыс-опухоленосителей наблюдается приближение исследуемого показателя к показателям группы необлученных крыс с карциномой Герена (рис. 6в).



а



б



в

Рисунок 6.

Скорость восстановления-окисления цитохрома b_5 в микросомной фракции печени предварительно облученных крыс-опухоленосителей.

1 - интактные животные; 2 - облученные животные; 3 - животные, которым трансплантировали опухолевые клетки; 4 - животные, которым по окончании 7-ми суточного облучения трансплантировали опухолевые клетки; 5 - облученные крысы на 1-е сутки после действия радиации; а, б, в - предварительно облученные крысы-опухоленосители на 7, 14, 21-е сутки после трансплантации опухоли соответственно

* - статистически достоверная разница в сравнение с контрольным показателем ($p \leq 0,05$);

** - статистически достоверная разница в сравнение с показателем крыс-опухоленосителей ($p \leq 0,05$).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ И ВЫВОДЫ. Полученные данные позволяют заключить, что облучение организма, предшествующее трансплантации опухоли, приводит к снижению как ферментативной активности NADH-цитохром b_5 редуктазы, так и содержания цитохрома b_5 в микросомной фракции карциномы Герена в латентную и логарифмическую фазы онкогенеза в сравнении с необлучёнными опухоленосителями. В то же время, повышается скорость восстановления-окисления цитохрома b_5 при передаче электронов на цитохром P450.

В микросомной фракции печени облученных крыс в условиях роста в организме карциномы Герена в латентную и логарифмическую фазы онкогенеза снижается содержание цитохрома b_5 , однако повышается ферментативная активность NADH-цитохром b_5 редуктазы и скорость восстановления-окисления цитохрома b_5 . Повышение передачи электронов исследуемыми компонентами NADH-зависимой редокс-цепи в данной ситуации имеет негативное значение, поскольку активность основного акцептора электронов – цитохрома P450 снижается. NADH-цитохром b_5 редуктаза и цитохром b_5 в микросомной фракции печени облучённых крыс-опухоленосителей, вероятнее всего, принимают участие в интенсификации свободно-радикальных процессов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Gan L., von Moltke L.L., Trepanier L.A., Harmatz J.S., Greenblatt D.J., Court M.H. (2009) American Society for Pharmacology and Experimental Therapeutics, **37**, 90-96.
2. Coon M.J. (2002) J. Biol. Chem., **277**, 28351-28363.
3. McLaughlin L.A., Ronseaux S., Finn R.D., Henderson C.J., Wolf C.R. (2010) Mol. Pharmacol., **78**, 269-278.
4. Marchenko M.M., Kopyl'chuk G.P., Ketsa O.V. (2009) Biochemistry (Moscow) Supl. Series B: Biomed. Chem., **3**, 377-381.
5. Schenkman J.B., Cinti D.L. (1978) Methods Enzymol., **52**, 83-89.
6. Орехович В.Н. (1977) Современные методы в биохимии, Медицина, М.
7. Lowry O.H., Rosebrough M.J., Farr A.L., Randal R.J. (1951) J. Biol. Chem., **193**, 265-275.
8. Kurian J.R., Bajad S.U., Miller J.L., Chin N.A., Trepanier L.A. (2004) JPET, **311**, 1171-1178.
9. Yantsevich A.V., Gilep A.A., Usanov S.A. (2008) Biochemistry (Moscow), **73**, 1096-1107.
10. Hammond K.P., Strobel H.W. (1990) Mol. Cell. Biochem., **93**, 95-105.
11. Марченко М.М., Кеца О.В., Великий М.М. (2011) Біохімічна трансформація ксенобіотиків у організмі, Чернівецький нац. ун-т, Чернівці.
12. Chandra D., Kale R.K. (1999) Int. J. Radiat. Biol., **3**, 335-349.
13. Кржечковская В.В. (2005) Критические технологии. Мембраны, **26**, 10-22.
14. Parthasarathy S., Wang W., Gibney B.R., Battaile K.P., Lovell S., Benson D.R., Zhu H. (2010) J. Biol. Chem., **285**, 30181-30191.
15. Finn R.P., McLaughlin L.A., Ronseaux S., Rosewell J., Houston J.B., Henderson C.J., Wolf C.R. (2008) J. Biol. Chem., **283**, 31385-31393.

Поступила: 21. 06. 2011.

**FUNCTIONAL ACTIVITY OF NADH-DEPENDENT REDUCTASE SYSTEM
IN LIVER AND GUERIN'S CARCINOMA MICROSOMAL FRACTION
IN RATS EXPOSED TO PRELIMINARY IRRADIATION**

M.M. Marchenko, O.V. Ketsa

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

The activity of liver and Guerin's carcinoma microsomal NADH-dependent reductase system has been investigated in tumor-bearing rats exposed to preliminary irradiation. Preliminary irradiation of rats (before transplantation of Guerin's carcinoma) resulted in the decrease of NADH-cytochrome b_5 reductase activity and contents of cytochrome b_5 in the Guerin's carcinoma microsomal fraction in the logarithmic phases of oncogenesis compared with the non-irradiated tumor-bearing rats.

The effect of irradiation preceding transplantation of the tumor to rats results in the increase of enzymatic activities of liver microsomal NADH-cytochrome b_5 reductase in the latent and logarithmic phases of tumor growth as compared with non-irradiated tumor-bearing rats. At the same time the contents of cytochrome b_5 decreases. During longer periods after irradiation the investigated parameters approached to those in the group of non-irradiated tumor-bearing animals.

Key words: NADH-cytochrome b_5 reductase, cytochrome b_5 , microsomal fraction, liver, Guerin's carcinoma.