

УДК 591.111.1.-112.4:616-006.6

©Марченко, Волощук

СОСТОЯНИЕ СИСТЕМЫ ЭНЕРГООБЕСПЕЧЕНИЯ ЛЕЙКОЦИТОВ КРОВИ В ДИНАМИКЕ РОСТА КАРЦИНОМЫ ГЕРЕНА В УСЛОВИЯХ ВЛИЯНИЯ НИЗКОДОЗОВОГО ОБЛУЧЕНИЯ

*М.М. Марченко, О.Н. Волощук**

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

Исследована NADH-дегидрогеназная, сукцинатдегидрогеназная и цитохромоксидазная активность митохондрий лейкоцитов периферической крови крыс с трансплантированной карциномой Герена в динамике онкогенеза в условиях предварительного облучения малыми дозами радиации. Показано, что в динамике роста карциномы Герена наблюдается торможение NADH-дегидрогеназной активности на фоне активации сукцинатдегидрогеназы с сохранением на терминальных этапах роста опухоли цитохромоксидазной активности на уровне значений контроля. В условиях предварительного низкодозового облучения опухоленосителей наблюдается тенденция к торможению исследуемых ферментативных активностей, начиная уже с начальных этапов онкогенеза.

Ключевые слова: карцинома Герена, лейкоциты, NADH-дегидрогеназная активность, сукцинатдегидрогеназная активность, цитохромоксидазная активность.

ВВЕДЕНИЕ

Состояние энергетического обмена является важным показателем функционирования организма при патологических состояниях, в том числе и при онкологических заболеваниях [1, 2]. Опухолевая прогрессия, протекающая на фоне снижения функций иммунной защиты и торможения иммунного ответа организма, может быть спровоцирована низким энергообеспечением клеток иммунной системы, поскольку полноценное функционирование системы энергообеспечения иммуноцитов является одним из необходимых условий эффективной работы системы иммунного надзора, направленной на элиминацию трансформированных клеток [3]. Метаболические превращения, происходящие в лейкоцитах периферической крови, отображают состояние обменных и регуляторных процессов в организме [4], а изучение активности отдельных звеньев энергетического обмена позволяет оценить эффективность функционирования системы энергообеспечения в условиях прогрессии опухолевого процесса.

Цель работы – исследовать NADH-дегидрогеназную, сукцинатдегидрогеназную и цитохромоксидазную активности митохондрий лейкоцитов периферической крови крыс с трансплантированной карциномой Герена в динамике онкогенеза в условиях предварительного облучения малыми дозами радиации.

МЕТОДИКА

Исследования проводили на 65 белых нелинейных крысах-самках массой 110-130 г и возрастом 2,5-3 месяца, содержащихся на стандартном рационе вивария. Эксперименты на животных проводили с учётом положений “Общих этических принципов экспериментов на животных”, принятых Первым Национальным конгрессом по биоэтике (г. Киев, 2001). Животные были разделены на группы: I – крысы с трансплантированной карциномой Герена (Op), II – облученные крысы, которым в 1-е сутки после окончания облучения трансплантировали карциному Герена (P+Op), III – интактные животные (K).

* - адресат для переписки

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 имени 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 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 легким эфирным наркозом с использованием метода цервикальной дислокации проводили на 7-е, 14-е, 21-е сутки после имплантации опухоли [6]. Выделение лейкоцитов периферической крови проводили по общепринятому методу [7]. Для выделения митохондриальной фракции суспензию лейкоцитов ресуспендировали с 5 объёмами буфера, содержащего 0,25 М сахарозу, 10 мМ фосфат калия, 1 мМ ЭДТА (pH 7,2). Суспензию клеток гомогенизировали. Гомогенат центрифугировали при 800 g на протяжении 10 мин. Осадок центрифугировали при 8000 g 10 мин и ресуспендировали с буфером без ЭДТА [8].

Определение NADH-дегидрогеназной активности проводили спектрофотометрическим методом [9]. NADH-дегидрогеназную

активность рассчитывали с учетом коэффициента молярной экстинкции $6,22 \cdot 10^3$ М⁻¹·см⁻¹. Сукцинатдегидрогеназную активность определяли по интенсивности восстановления феррицианида калия [10]. 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 [11]. Содержание белка определяли по Лоури [12]. Статистический анализ данных проводили с использованием критерия Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты наших исследований показали, что на начальном этапе онкогенеза в условиях предварительного облучения крыс малыми дозами радиации наблюдается снижение NADH-дегидрогеназной активности митохондрий лейкоцитов (Комплекс I дыхательной цепи) по сравнению с показателями необлучённых опухоленосителей в 2 раза, при этом достигая значений, ниже показателей интактных животных (рис. 1). В то же время, в динамике онкогенеза отмечена тенденция к снижению NADH-дегидрогеназной активности, и на терминальных этапах роста опухоли исследуемая ферментативная активность была в 2,2 раза ниже показателей интактных животных и в 1,7 раза ниже показателей, полученных в начальный период роста злокачественного новообразования. Торможение активности

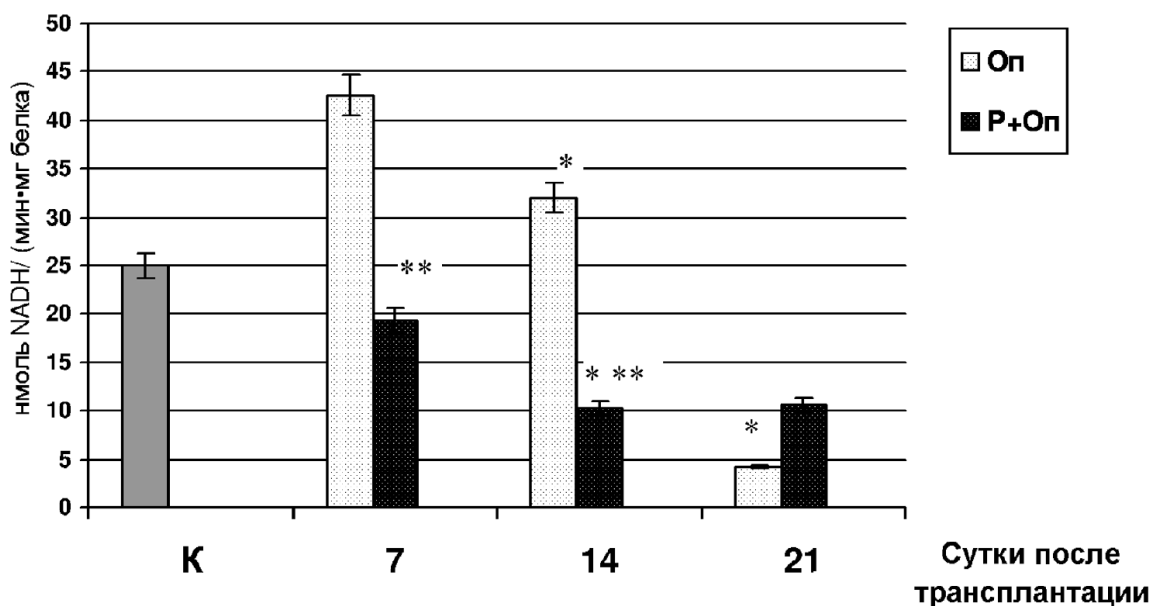


Рисунок 1. NADH-дегидрогеназная активность митохондрий лейкоцитов в динамике роста карциномы Герена в условиях предварительного облучения малыми дозами радиации. Здесь и в рисунках 2-3: * - достоверная разница по сравнению с предыдущей стадией эксперимента, $p \leq 0,05$; ** - достоверная разница по сравнению с необлучёнными опухоленосителями, $p \leq 0,05$.

изучаемого фермента митохондриальной системы энергообеспечения лейкоцитов опухоленосителей можно рассматривать как дополнительный критерий оценки степени нарушений энергетического обмена при опухолевой патологии. Установленный факт свидетельствует, что в условиях прогрессии злокачественного новообразования на фоне предварительного низкодозового облучения в митохондриях лейкоцитов опухоленосителей происходит нарушение способности транспортировать электроны в дыхательную цепь от NADH-зависимых субстратов.

Посредником между FAD-зависимыми субстратами и дыхательной цепью является сукцинатдегидрогеназа (Комплекса II дыхательной цепи), активность которой в значительной степени определяет скорость использования кислорода и синтеза АТФ в митохондриях в условиях нарушения активности NADH-дегидрогеназы [3]. Результаты проведённых исследований показали, что в динамике роста карциномы Герена в группе предварительно облученных опухоленосителей происходит активация сукцинатдегидрогеназы по сравнению с интактными животными; при этом максимальное значение активности этого фермента наблюдается в латентный период роста опухоли, с тенденцией к торможению в динамике туморогенеза (рис. 2). При этом, достоверных отличий в активности сукцинатдегидрогеназы в группах предварительно облученных и необлученных опухоленосителей на начальной стадии онкогенеза не установлено. Вероятно, увеличение потока электронов через Комплекс II дыхательной цепи митохондрий лейкоцитов в условиях нарушения работы

Комплекса I, способствует поддержанию энергообеспечения лейкоцитов. В то же время, следует отметить, что по сравнению с группой необлучённых опухоленосителей, предварительное облучение малыми дозами радиации в период активного и терминального периода роста карциномы Герена приводит к торможению исследуемой ферментативной активности в 4 и 1,5 раза соответственно. Установленный факт можно рассматривать как один из возможных механизмов усиления прогрессии опухоли в условиях предварительного облучения малыми дозами радиации.

Итак, в процессе прогрессии роста злокачественного новообразования в условиях предварительного облучения малыми дозами радиации наблюдается поэтапное торможение ферментативной активности как Комплекса I, так и Комплекса II электротранспортной цепи. В этих условиях, вероятно, поставщиком электронов в дыхательную цепь на терминальных этапах онкогенеза остаётся сукцинатдегидрогеназа, поскольку значения активности фермента превышают показатели контрольной группы животных.

Ключевым ферментом терминального участка дыхательной цепи является цитохромоксидаза [11]. Результаты наших исследований показали, что в группе предварительно облученных опухоленосителей цитохромоксидазная активность на латентной стадии роста карциномы Герена в 1,5 раза превышает показатели интактных животных, но в то же время ниже показателей, установленных для необлучённых опухоленосителей (рис. 3). В динамике онкогенеза наблюдается тенденция

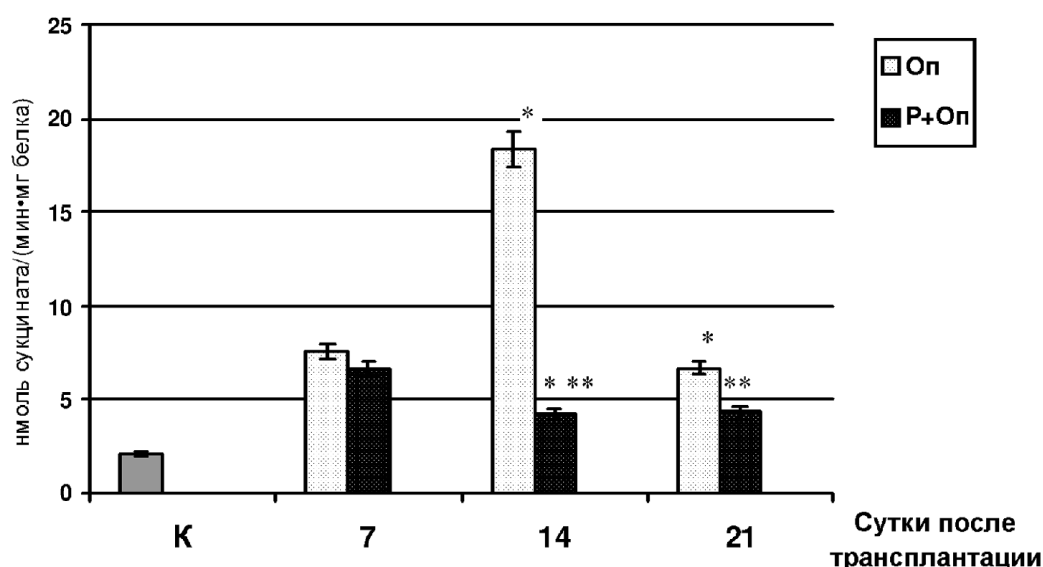


Рисунок 2. Сукцинатдегидрогеназная активность митохондрий лейкоцитов в динамике роста карциномы Герена в условиях предварительного облучения малыми дозами радиации.

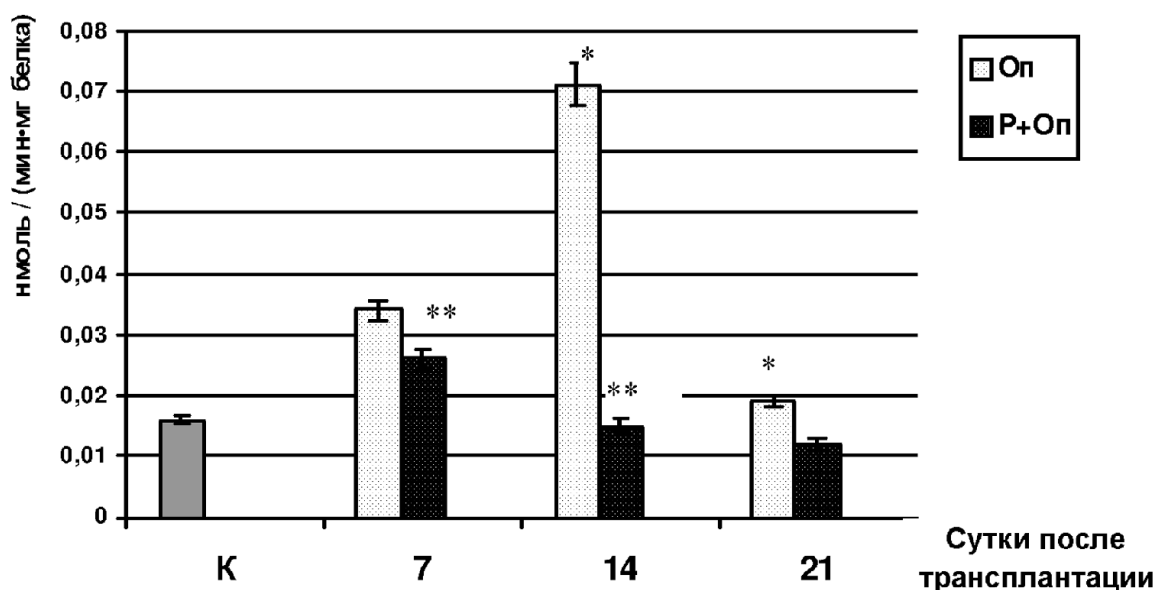


Рисунок 3. Цитохромоксидазная активность митохондрий лейкоцитов в динамике роста карциномы Герена в условиях предварительного облучения малыми дозами радиации.

к торможению цитохромоксидазной активности, сохраняясь на уровне показателей контроля. Сохранение цитохромоксидазной активности может рассматриваться как компенсаторный механизм, направленный на поддержку системы энергообеспечения в условиях повышенной потребности в энергии.

Результаты проведенных исследований свидетельствуют о том, что наиболее чувствительным компонентом дыхательной цепи митохондрий предварительно облученных опухоленосителей, ферментативная активность которого тормозится в первую очередь, является Комплекс I. Учитывая, что Комплекс I является основным продуцентом активных форм кислорода (АФК) в митохондриях [13], генерация которых резко возрастает в условиях онкогенеза и влияния облучения [14], и, в то же время, является наиболее чувствительным компонентом дыхательной цепи к окислительному стрессу [15], то установленный факт торможения активности NADH-дегидрогеназы представляется вполне “метаболически обоснованным”.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ И ВЫВОДЫ

В динамике роста карциномы Герена наблюдается торможение NADH-дегидрогеназной активности на фоне активации сукцинатдегидрогеназы с сохранением на терминальных этапах роста опухоли цитохромоксидазной активности на уровне значений контроля. В условиях предварительного низкодозового облучения опухоленосителей наблюдается тенденция

к торможению исследуемых ферментативных активностей начиная уже с начальных этапов онкогенеза. Установленные закономерности работы энзимов дыхательной цепи митохондрий лейкоцитов могут быть определяющими в обеспечении их функционирования при опухолевом росте в условиях предварительного облучения организма.

ЛИТЕРАТУРА

1. Мишунина Т.М. (2009) Журн. АМН України, **15**, 417-448.
2. Seyfried T.N., Shelton L.M. (2010) *Nutrit. Metabol.*, **7**, 1-22.
3. MacIver N.J., Jacobs S.R., Wieman H.L. et al. (2008) *J. Leukocyte Biol.*, **84**, 949-957.
4. Лапешин П.В., Савченко А.А., Дыхно Ю.А. и др. (2005) *Сибирский онкол. журн.*, **3**(15), 48-53.
5. Марченко М.М., Волощук О.Н. (2012) *Радиац. биол. Радиоэкология*, **52**, 496-502.
6. Марченко М.М., Копыльчук Г.П., Шмараков И.А. (2006) *Вопр. онкол.*, **52**, 63-65.
7. Schroder J.M., Mrowietz U., Christophers E. (1988) *J. Immunol.*, **140**, 3534-3540.
8. Biswas S., Ray M., Misra S., Dutta D.P., Ray S. (1997) *Biochem. J.*, **323**, 343-348.
9. Sharova I.V., Vekshin N.L. (2004) *Biophysic.*, **49**, 814-821.
10. Марченко М.М., Копыльчук Г.П., Волощук О.М. (2011) *Доповіді НАН України*, **1**, 153-156.
11. Волощук О.Н., Марченко М.М., Мудрак М.С. (2012) *Биомед. химия*, **58**, 684-690.
12. Lowry O.H., Rosebrough M.J., Farr A.L., Randal R.J. (1951) *J. Biol. Chem.*, **193**, 265-275.

13. Grivennikova K.G., Vinogradov A.D. (2006) Biochem. Biophys. Res. Commun., **1757**, 553-561.
14. Марченко М.М., Копильчук Г.П., Волощук О.М. (2008) Укр. біохім. журн., **80**, 114-119.
15. Андреев А.Ю., Кушнарева Ю.Е., Старков А.А. (2005) Биохимия, **70**, 246-260.

Поступила: 15. 09. 2013.

THE STATE OF THE MITOCHONDRIAL ENERGY-SUPPLYING SYSTEM OF BLOOD LEUKOCYTES IN THE DYNAMICS OF GUERIN'S CARCINOMA GROWTH UNDER THE LOW-LEVEL IRRADIATION CONDITIONS

M.M. Marchenko, O.N. Voloshchuk

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

Mitochondrial NADH-dehydrogenase, succinate dehydrogenase and cytochrome oxidase activities of peripheral blood leukocytes of rats with the grafted Guerin's carcinoma were studied in the dynamics of oncogenesis under the conditions of the preliminary low-level irradiation. Tumor growth was accompanied by a decrease in NADH-dehydrogenase activity, an increase of succinate dehydrogenase activity. Cytochrome oxidase activity of leucocytes remained at the control level up to the terminal stages of tumor growth. Preliminary low-level irradiation of the tumor bearing animals caused a tendency to the decrease of enzymatic activities studied. This tendency was observed from the initial stages of oncogenesis.

Key words: Guerin's carcinoma, leukocytes, NADH-dehydrogenase activity, succinate dehydrogenase activity, cytochrome oxidase activity.