

ЭНЗИМАТИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ КОМПОНЕНТОВ СИСТЕМЫ ЭНЕРГООБЕСПЕЧЕНИЯ МИТОХОНДРИЙ ЛЕЙКОЦИТОВ КРОВИ В ДИНАМИКЕ РОСТА КАРЦИНОМЫ ГЕРЕНА

О.Н. Волощук, М.М. Марченко

*Черновицкий национальный университет им. Юрия Федьковича, г. Черновцы, Украина
58000, Украина, г. Черновцы, ул. Чапаева, 45А/60, oxbm@mail.ru*

Изучена NADH-дегидрогеназная, сукцинатдегидрогеназная и цитохромоксидазная активность митохондрий лейкоцитов периферической крови крыс с трансплантированной карциномой Герена в динамике онкогенеза. 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.

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

ENZYMATIC ACTIVITY OF COMPONENTS OF ENERGY SUPPLY SYSTEM OF MITOCHONDRIES OF PERIPHERAL BLOOD LEUKOCYTES IN DYNAMICS OF GERENA'S CARCINOMA GROWTH

O.N. Voloschuk, M.M. Marchenko

*Yuriy Fedkovych Chernivtsi National University, Chernivtsi, Ukraine
45A/60 Chapaeva Street, 58000-Chernivtsi, Ukraine, e-mail: oxbm@mail.ru*

The NADH-dehydrogenase, succinate dehydrogenase and cytochromoxidase activities of mitochondries of blood peripheral leukocytes were studied in rats with transplanted Gerena's carcinoma. It was shown that in dynamics of Gerena's carcinoma growth, NADH-dehydrogenase activity was inhibited, while succinate dehydrogenase activity was activated. The level of cytochromoxidase activity remained within the control values at the terminal stage of tumor growth.

Key words: Gerena's carcinoma, leukocytes, NADH-dehydrogenase, succinate dehydrogenase activity, cytochromoxidase activity.

Опухолевая прогрессия, сопровождающаяся снижением функций иммунной защиты и торможением 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 [10]. Эффективность функционирования системы энергообеспечения в условиях развития опухолевого процесса можно оценить, изучая активность отдельных звеньев энергетического обмена митохондрий лейкоцитов, так как метаболические превращения, происходящие в лейкоцитах, отражают состояние обменных и регуляторных процессов в организме [3]. В то же время остается открытым вопрос о последовательности биохимических реакций, определяющих

развитие энергетического дисбаланса в лейкоцитах при онкогенезе.

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

Материал и методы

Исследования проводили на белых нелинейных крысах-самках (n=36) массой 110–130 г, в возрасте 2,5–3 мес, содержащихся на стандартном рационе вивария. Работу с животными проводили с учетом положений «Общих этических принципов экспериментов на животных», принятых Первым Национальным конгрессом по биоэтике (г. Киев, 2001). Животные были разделены на две группы: I – крысы с трансплантированной карциномой Герена (Op), II – интактные животные (К). Транс-

плантацию карциномы Герена проводили путем подкожного введения 0,5 мл 30 % суспензии раковых клеток в изотоническом растворе натрия хлорида. Штамм опухоли был предоставлен Институтом экспериментальной патологии, онкологии и радиобиологии им. Р.Е. Кавецкого НАН Украины (г. Киев). Длительность эксперимента составляла 21 сут. Эвтаназию под легким эфирным наркозом с использованием метода цервикальной дислокации проводили на 7, 14, 21-е сут после имплантации опухоли [4].

Выделение лейкоцитов периферической крови проводили по общепринятому методу [11]. Для выделения митохондриальной фракции суспензию лейкоцитов ресуспендировали с 5 объемами буфера, содержащего 0,25 М сахарозы, 10 мМ фосфата калия, 1 мМ ЭДТА (рН 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 [7].

NADH-дегидрогеназную активность определяли с помощью спектрофотометрического метода [12] и рассчитывали с учетом коэффициента молярной экстинкции $6,22 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \times \text{см}^{-1}$. Сукцинатдегидрогеназную активность определяли по интенсивности восстановления феррицианида калия [6]. 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 [2]. Содержание белка определяли по Лоури [9]. Статистический анализ данных проводили с использованием критерия Стьюдента.

Результаты и обсуждение

Результаты проведенных исследований показали, что в митохондриальной фракции лейкоцитов периферической крови опухоленосителей наблюдается повышение NADH-дегидрогеназной активности по сравнению с показателями контрольной группы животных уже на начальной стадии роста карциномы Герена (рис. 1). В исследуемый период онкогенеза NADH-дегидрогеназная активность в 1,7 раза превышает показатели интактных животных. Вероятно, установленный факт отражает усиление защитных реакций при участии клеток иммунной системы, которые преимущественно реализуются путем индукции секреции лейко-

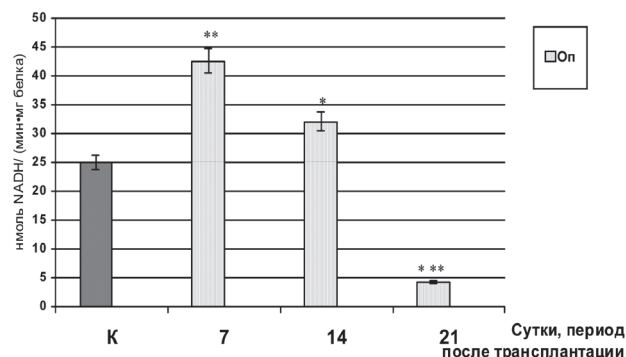


Рис. 1. NADH-дегидрогеназная активность митохондрий лейкоцитов в динамике роста карциномы Герена. Примечание: * – различия статистически значимы по сравнению с предыдущей стадией эксперимента; ** – по сравнению с контрольной группой

цитами активных низкомолекулярных веществ, направленных на уничтожение опухолевых клеток [4, 6]. В то же время в динамике роста злокачественного новообразования наблюдается тенденция к снижению NADH-дегидрогеназной активности. Так, уже на стадии активного роста карциномы Герена наблюдается торможение исследуемой ферментативной активности в 1,3 раза по сравнению с начальной стадией туморогенеза, а в терминальный период зарегистрировано торможение NADH-дегидрогеназной активности почти в 10 раз. Учитывая, что NADH-дегидрогеназа, обеспечивающая главный путь окисления NADH в митохондриях, является ключевым ферментом I комплекса дыхательной цепи, установленное нами торможение его активности можно рассматривать как одно из возможных звеньев механизма, запускающего другие пути повреждения и снижения функциональной активности клеток иммунной системы при опухолевой прогрессии. Торможение NADH-дегидрогеназной активности в динамике онкогенеза свидетельствует о нарушении в митохондриях лейкоцитов способности транспортировать электроны в дыхательную цепь от NADH-зависимых субстратов. Поэтому на следующем этапе исследований актуальным было изучение сукцинатдегидрогеназной активности лейкоцитов периферической крови опухоленосителей как посредника между FAD-зависимыми субстратами и дыхательной цепью. Именно активность сукцинатдегидрогеназы как компонента II комплекса дыхательной цепи в значительной степени определяет скорость использования кислорода и

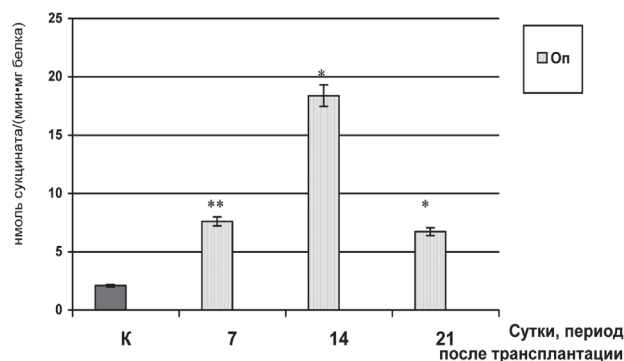


Рис. 2. Сукцинатдегидрогеназная активность митохондрий лейкоцитов в динамике роста карциномы Герена. Примечание: * – различия статистически значимы по сравнению с предыдущей стадией эксперимента; ** – по сравнению с контрольной группой

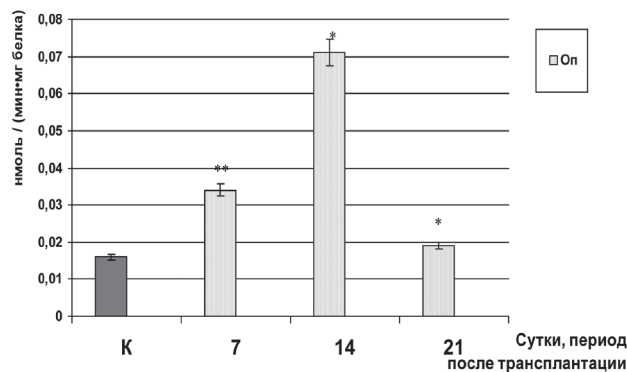


Рис. 3. Цитохромоксидазная активность митохондрий лейкоцитов в динамике роста карциномы Герена. Примечание: * – различия статистически значимы по сравнению с предыдущей стадией эксперимента; ** – по сравнению с контрольной группой

синтеза АТФ в митохондриях в условиях нарушения активности NADH-дегидрогеназы.

Результаты наших исследований показали, что в динамике роста карциномы Герена наблюдается активация сукцинатзависимого пути окисления. Максимального значения сукцинатдегидрогеназная активность достигает в период активного роста опухоли (рис. 2), что, вероятно, отражает активацию компенсаторных метаболических потоков в условиях повышенной потребности в энергии, позволяющей сохранить энергосинтезирующую функцию цитохромного участка дыхательной цепи митохондрий лейкоцитов. Возможно, именно активация сукцинатзависимого пути окисления обеспечивает транспорт электронов через систему цитохромов с сохранением способности к окис-

лительному фосфорилированию. В то же время, несмотря на снижение сукцинатдегидрогеназной активности лейкоцитов опухоленосителей на терминальных этапах онкогенеза, ее значения превышают показатели интактных животных втрое.

Итак, на терминальных этапах роста злокачественного новообразования наблюдается торможение ферментативной активности как I, так и II комплекса электротранспортной цепи, при этом, вероятно, поставщиком электронов в дыхательную цепь остается сукцинатдегидрогеназа, поскольку значения активности фермента превышают показатели контрольной группы животных. Вместе с тем результаты проведенных нами исследований показали, что в начальный период роста карциномы Герена наблюдается повышение активности цитохромоксидазы с тенденцией к торможению на терминальных этапах онкогенеза (рис. 3). Максимального значения активность исследуемого фермента электротранспортной цепи достигает на стадии активного роста злокачественного новообразования и совпадает с активацией сукцинатзависимого пути окисления. Установленное повышение цитохромоксидазной активности может быть рассмотрено как компенсаторный механизм, направленный на поддержку системы энергообеспечения организма в условиях повышенной потребности в энергии. В то же время в терминальный период роста опухоли наблюдается торможение цитохромоксидазной активности, но следует отметить, что она сохраняется на уровне значений интактных животных.

Итак, на начальных этапах туморогенеза наблюдается возрастание цитохромоксидазной активности на фоне активации сукцинатзависимого пути окисления с тенденцией к торможению на терминальных этапах роста карциномы Герена. Результаты наших исследований дают возможность сделать вывод, что наиболее чувствительным компонентом дыхательной цепи митохондрий опухоленосителей, ферментативная активность которого тормозится в первую очередь, является Комплекс I. Учитывая, что Комплекс I является основным продуцентом активных форм кислорода в митохондриях [8], генерация которых возрастает в условиях онкогенеза [5], и в то же время является компонентом дыхательной цепи, наиболее чувствительным к окислительному стрессу [1], то установленный факт торможения активности NADH-дегидрогеназы представляется

вполне логичным. Компенсаторная активация «укороченной» дыхательной цепи в данных экспериментальных условиях, вероятно, обеспечивает поддержание работы электронотранспортной цепи лейкоцитов в условиях нарушения работы Комплекса I. Установленные закономерности работы дыхательной цепи митохондрий лейкоцитов могут быть определяющими в обеспечении их функционирования при опухолевом росте.

ЛИТЕРАТУРА

1. Андреев А.Ю., Кушнарёва Ю.Е., Старков А.А. Метаболизм активных форм кислорода в митохондриях // Биохимия. 2005. Т. 70, вып. 2. С. 246–260.
2. Волощук О.Н., Марченко М.М., Мудрак М.С. Изменение структурно-функциональной организации цитохромного участка дыхательной цепи карциномы Герена предварительно облученных опухоленосителей // Биомедицинская химия. 2012. Т. 58, № 6. С. 684–690.
3. Лапешин П.В., Савченко А.А., Дыхно Ю.А. и др. Состояние активности НАД(Ф)-зависимых дегидрогеназ в лимфоцитах крови и в клетках здоровой и опухолевой ткани легкого у больных немелкоклеточным раком легкого // Сибирский онкологический журн. 2005. № 3 (15). С. 48–53.
4. Марченко М.М., Копильчук Г.П., Шмараков И.А. Влияние предварительного облучения на ДНКазную активность и степень фрагментации ДНК ядер клеток карциномы Герена // Вопросы онкологии. 2006. Т. 52, № 1. С. 63–65.
5. Марченко М.М., Копильчук Г.П., Волощук О.М. Вплив низьких доз іонізуючого випромінювання на фракційний склад мітохондріальних білків і мтДНК карциноми Герена // Укр. біохім. журн. 2008. Т. 80, № 4. С. 114–119.
6. Марченко М.М., Копильчук Г.П., Волощук О.М. Активність ферментів енергозабезпечення карциноми Герена, трансплантованої на фоні попереднього опромінення малими дозами // Доповіді НАН України. 2011. № 1. С. 153–156.
7. Марченко М.М., Волощук О.Н. Состояние цитохромного участка дыхательной цепи печени крыс-опухоленосителей в условиях предварительного облучения малыми дозами радиации // Радиационная биология. Радиоэкология. 2012. Т. 52, № 5. С. 496–502.
8. Grivennikova K.G., Vinogradov A.D. Generation of superoxide by the mitochondrial Complex I // Bioch. Biophys. 2006. Vol. 1757. P. 553–561.
9. Lowry O.H., Rosenbrough M.J., Farr A.L., Rendal R.J. Protein measurement with the folin phenol reagent // J. Biol. Chem. 1951. Vol. 193, № 1. P. 265–275.
10. MacIver N.J., Jacobs S.R., Wieman H.L. et al. Glucose metabolism in lymphocytes is a regulated process with significant effects on immune cell function and survival // J. Leukocyte Biol. 2008. Vol. 84 (4). P. 949–957.
11. Schroder J.M., Mrowietz U., Christophers E. Purification and partial biologic characterization of a human lymphocyte-derived peptide with potent neutrophil-stimulating activity // J. Immunol. 1988. Vol. 140, № 10. P. 3534–3540.
12. Sharova I.V., Vekshin N.L. Rotenone-insensitive NADH oxydation in mitochondrial suspension occurs by NADH dehydrogenase of respiratory chain fragments // Biophysic. 2004. Vol. 49 (5). P. 814–821.

Поступила 6.09.13