

## ВПЛИВ НИЗЬКИХ ДОЗ ІОНІЗУЮЧОГО ВИПРОМІНЮВАННЯ НА ФРАКЦІЙНИЙ СКЛАД МІТОХОНДРІАЛЬНИХ БІЛКІВ І мтДНК КАРЦИНОМИ ГЕРЕНА

М. М. МАРЧЕНКО, Г. П. КОПИЛЬЧУК, О. М. ВОЛОЩУК

Чернівецький національний університет, Україна;  
e-mail: oxbm@mail.ru

У роботі досліджено вплив попереднього опромінення низькими дозами радіації на фракційний склад мітохондріальних білків, нерозчинних в 0,05 М Na-фосфатному буфері (рН 11,5), рівень окислювальної модифікації їх та ступінь фрагментації мтДНК карциноми Герена щурів у динаміці розвитку онкозахворювання. Показано, що вплив низьких доз іонізуючої радіації найбільш виражений на початкових етапах пухлинного процесу. Встановлено, що онкогенез супроводжується зміною фракційного складу мітохондріальних білків, нерозчинних в 0,05 М Na-фосфатному буфері (рН 11,5), а саме зниженням інтенсивності забарвлення смуг білків з молекулярними масами 32–66 кДа та посиленням гетерогенності на проміжку молекулярних мас від 8 до 24 кДа. Зміна фракційного складу досліджуваних мітохондріальних білків відбувається на фоні інтенсифікації окислювальної модифікації їх, зокрема накопичення карбонільних похідних і зниження вмісту вільних SH-груп, а також інтенсифікації фрагментації мтДНК.

*Ключові слова:* карцинома Герена, попереднє фракціоноване опромінення, низькі дози радіації, мітохондріальні білки, мтДНК, окислювальна модифікація мтДНК.

Пусковою ланкою під час реалізації цито- і генотоксичного ефекту радіації вважають утворення у клітинах активних кисневих метаболітів [1, 2], основним джерелом яких є мітохондрії [3, 4]. Радіаційно-індуковані зміни функціональної активності мітохондрій пов'язані зі зміною структури мембранних білків та ліпідів [5], а саме зростанням конформаційної рухливості молекул білків внутрішньої мітохондріальної мембрани, зміною жирнокислотного складу фосфоліпідів, активацією процесів пероксидного окислення ліпідів. Окрім того, чутливою мішенню для дії радіації є мітохондріальна ДНК (мтДНК). Чутливість мтДНК до дії іонізуючої радіації зумовлена тим, що вона не захищена білками, не містить некодуючих ділянок і механізми її репарації менш ефективні, ніж ядерної ДНК [6, 7]. Такі зміни структурно-функціональної організації мітохондрій за впливу іонізуючої радіації виявляються ініціюючими у злоякісному переродженні клітин, а клітину з мутантним набором мітохондрій розглядають як початок росту пухлини (злоякісної або доброякісної) [8]. Отже, одним із механізмів онкогенезу є активація в мітохондріях вільнорадикальних пероксидних процесів, які спричинюють неспецифічні зміни клітинного окисного метаболізму, спрямо-

вані на підтримку адекватного енергетичного забезпечення [9, 10]. Проте слід зазначити, що питання щодо особливостей окислювального пошкодження мтДНК та мітохондріальних білків у процесі прогресування пухлини, особливо за дії низьких доз радіації, залишається недостатньо вивченим. У зв'язку з цим метою нашої роботи було вивчення впливу низьких доз іонізуючого випромінювання на фракційний склад мтДНК і білків, які кодується мтДНК, у трансформованій тканині в динаміці розвитку карциноми Герена.

### Матеріали і методи

Дослідження проводили на білих безпородних щурах з масою тіла 110–130 г. Тварин було поділено на групи: I – тварини з трансплантованою карциномою Герена (Пх), II – попередньо опромінені пухлиноносії (Р+Пх).

Опромінення проводили протягом семи діб щоденно дозою  $36,12 \cdot 10^{-4}$  Кл/кг (загальна доза  $258 \cdot 10^{-4}$  Кл/кг) через 24 години на рентгенівській діагностичній установці 12П6 (Lachema, Чехія) за потужності дози  $2,58 \cdot 10^{-4}$  Кл/кг (0,93 сГр/с), напруги 80 кВ, сили струму 40 мА, шкірно-фокусної відстані 40 см з використанням фільтрів Cu (0,5 мм). У першу добу після припинення опромінення проводили трансплантацію карциноми Герена шляхом

підшкірного введення 0,5 мл 30%-ої суспензії ракових клітин в ізотонічному розчині натрію хлориду. Штам пухлини був наданий Інститутом експериментальної патології, онкології і радіобіології ім. Р. Є. Кавецького НАН України.

Тривалість експерименту становила 21 добу. Евтаназію проводили на 7-у (латентна стадія пухлинного росту), 14-у (логарифмічна стадія пухлинного росту) і 21-у (термінальна стадія пухлинного росту) добу після імплантації пухлини під легким ефірним наркозом.

Виділення мітохондріальної фракції проводили методом диференційного центрифугування в середовищі гомогенізації: 250 мМ сахароза, 1 мМ ЕДТА, 10 мМ трис-НСІ, рН 7,4 [11], при 0–3 °С.

Мітохондріальні білки виділяли методом [12], який базується на нерозчинності продуктів мітохондріальної трансляції у 0,05 М Na-фосфатному буфері (рН 11,5). Суспензію мітохондрій заморожували при –20 °С протягом ночі. Після відтаювання її центрифугували 20 хв при 30 000 г. Осад ресуспендували в 20 мл 0,05 М Na-фосфатного буфера (рН 11,5) і осаджували протягом 20 хв при 30 000 г. Цю процедуру повторювали. Кінцевий осад, нерозчинний у фосфатному буфері, є білками, синтезованими на мітохондріях.

Осад мітохондріальних білків розчиняли в буфері для зразків, що містив: 0,0625 М трис-НСІ (рН 6,8), 5%-й 2-меркаптоетанол, 2%-й SDS, 10%-й гліцерол, 0,005%-й бромфеноловий синій, 8 М сечовину. Попереднє оброблення маркерів і зразків було однаковим.

Електрофорез в 10%-му поліакриламідному гелі проводили в системі Леммлі [13] на пластинках (13×12×0,1 см). Як маркери молекулярної маси використовували білки: бичачий сироватковий альбумін (66 кДа), овальбумін (45 кДа), апротонін (6,5 кДа). Після електрофорезу гелі фіксували сумішшю 25%-го ізопропанолу та 10%-го ацетату протягом години, забарвлення поліпептидів проводили Coomassie blue R-250.

Сканували електрофореграми на апараті GelDoc 2000 та аналізували з використанням програми Quantity One (Bio-Rad, США).

Рівень карбонілювання білків оцінювали за допомогою 2,4-динітрофенілгідразину [14], вміст білкових SH-груп – реагенту Елмана [15]. Вміст білка визначали за Лоурі [16].

Виділення мтДНК здійснювали фенольним методом [17]. мтДНК розділяли методом електрофорезу в 0,8%-му агарозному гелі. Електрофорез проводили у трис-боратному буфері (рН 8,0) при напрузі електричного поля 5 В/см.

Для розділення використовували горизонтальні пластини (12,5 × 8,5 см), товщина гелю – 5 мм. Як маркери використовували маркерні препарати ДНК фага λ, одержані розщепленням рестриктазами EcoRI та HindIII. Гелі забарбовували розчином бромистого етидію з концентрацією 0,5 мкг/мл, сканували на апараті GelDoc 2000; аналізували за допомогою програми Quantity One (Bio-Rad, США).

Одержані дані статистично обробляли з використанням критерію Стьюдента.

### Результати та обговорення

На початкових етапах розвитку карциноми Герена електрофоретичний аналіз білків мітохондріальної фракції пухлинної тканини, нерозчинних в 0,05 М Na-фосфатному буфері (рН 11,5), дозволяє ідентифікувати 16 смуг з молекулярними масами від 21 до 66 кДа (рис. 1, 1). У групі попередньо опромінених пухлиноносіїв у досліджуваній період онкогенезу на електрофореграмах у межах білків із молекулярними масами 32 – 43 кДа виявляються додаткові смуги з молекулярними масами 34, 40, 41 кДа (рис. 1, 2).

На подальших етапах пухлиногенезу відмінностей між електрофоретичними спектрами мітохондріальних білків обох досліджуваних груп тварин не виявляється. Проте вже на стадії активного росту пухлини порівняно з латентною фазою фіксуються значні зміни електрофоретичних спектрів досліджуваних білків дихального ланцюга в обох досліджуваних групах тварин – зростає інтенсивність забарвлення білкових смуг з молекулярними масами 43, 47 і з'являється інтенсивно забарвлена смуга 32 кДа (рис. 1, 3, 4). На термінальних етапах пухлинного росту відмічено різке зниження інтенсивності забарвлення смуг в межах 32–66 кДа і значне підвищення вмісту низькомолекулярних компонентів з молекулярними масами від 8 до 24 кДа. Отже, у процесі пухлинного росту відбуваються істотні зміни фракційного складу мітохондріальних білків, нерозчинних в 0,05 М Na-фосфатному буфері (рН 11,5). З одного боку, ймовірно, однією з причин зареєстрованих змін фракційного складу досліджуваних мітохондріальних білків в області високих молекулярних мас може бути деградація мтДНК, оскільки є дані, що білки, які кодується мтДНК пухлинних клітин, виявляють особливості, що свідчать про зміни в її первинній структурі [18]. Результати наших досліджень показали, що зміна електрофоретичних спектрів мітохондріальних білків, які кодується мтДНК, відбувається на фоні

1 2 3 4 5 6

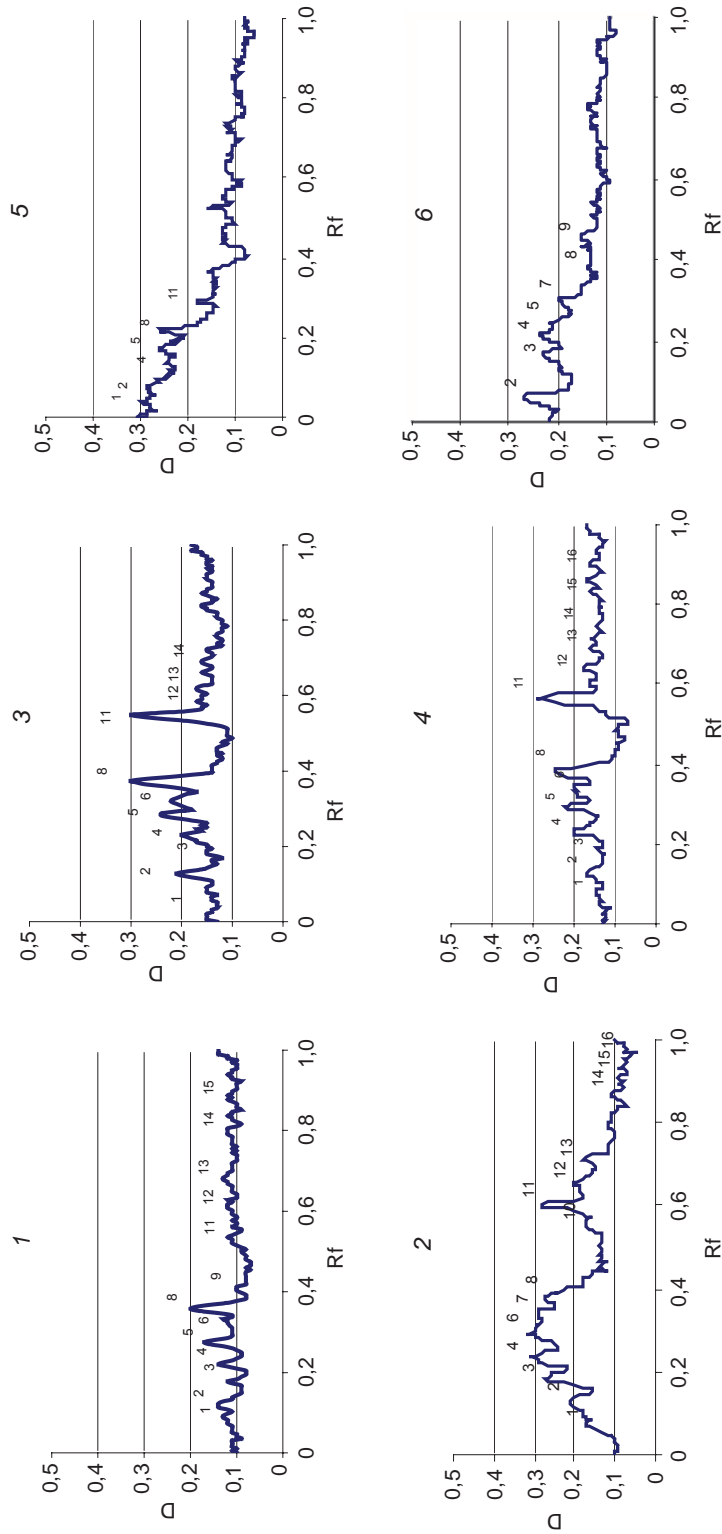
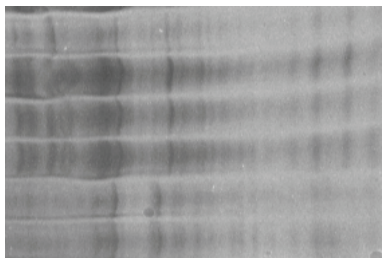


Рис. 1. Електрофореграми і денситограми білків, нерозчинних в 0,05 М Na-фосфатному буфері (рН 11,5), трансформованої тканини щурів-пухлинносів і попередньо опромінених пухлинносів у динаміці розвитку карциноми Герена: 1, 3, 5 – пухлинносії, відповідно 7-, 14-, 21-а доба після трансплантації, 2, 4, 6 – попередньо опромінені пухлинносії, відповідно 7-, 14-, 21-а доба після трансплантації. Молекулярні маси досліджуваних білків, кДа: 1 – 66; 2 – 63,5; 3 – 57; 4 – 52; 5 – 50; 6 – 47; 7 – 45; 8 – 43; 9 – 38; 10 – 34; 11 – 32; 12 – 30; 13 – 28; 14 – 24; 15 – 22; 16 – 21

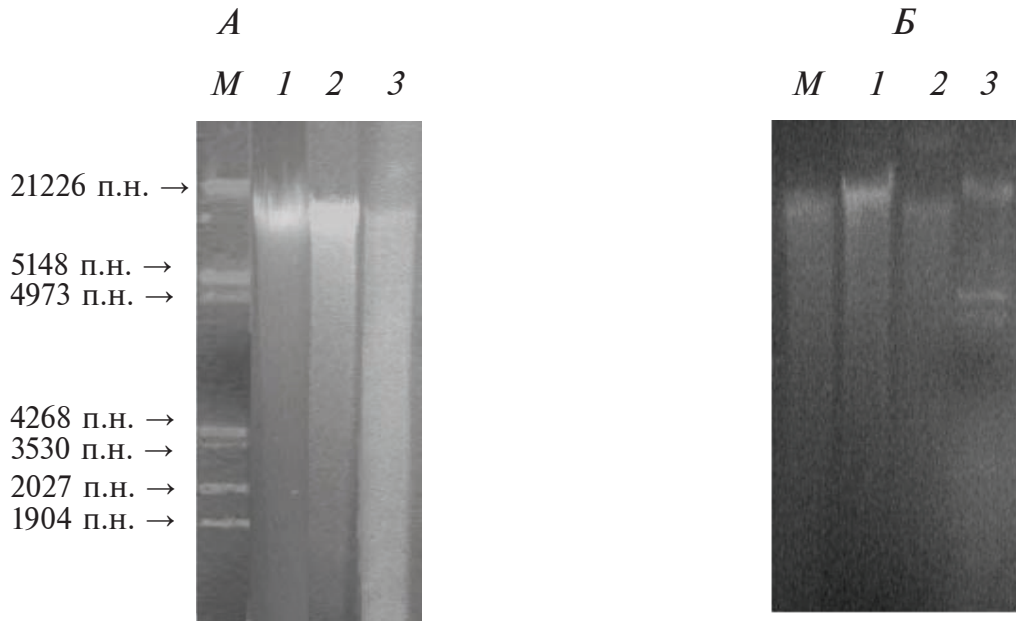


Рис. 2. Електрофореграми фрагментів мітохондріальної ДНК карциноми Герена неопромінених (А) та попередньо опромінених пухлиноносіїв (Б) у процесі розвитку новоутворення: М – маркерний препарат, 1, 2, 3 – відповідно 7-, 14-, 21 доба після трансплантації

фрагментації мтДНК трансформованих клітин з накопиченням гетерогенних фрагментів різних розмірів (рис. 2). Попереднє опромінування низькими дозами посилює пригнічення процесів фрагментації мтДНК на початкових етапах пухлинного росту: якщо в неопромінених пухлиноносіїв на початкових етапах експерименту було виявлено гетерогенну фракцію мтДНК фрагментів розміром 14,5 і 13,5 т.п.н. (рис. 2, А), то у групі опромінених – гомогенну фракцію фрагментів розміром 14 т.п.н. (рис. 2, Б).

З іншого боку, причиною зростання вмісту низькомолекулярних компонентів нерозчинних в 0,05 М Na-фосфатному буфері (рН 11,5) білків може бути окислювальна модифікація їх з імовірною подальшою деградацією мітохондріальними протеїназами, оскільки відомо, що саме окисномодифіковані білки в першу чергу підлягають деградації [19, 20]. У групі пухлиноносіїв дослідження інтенсивності окислювальних пошкоджень мітохондріальних білків пухлинної тканини показало підвищення вмісту карбонільних похідних упродовж усього експериментального періоду (рис. 3, А) на фоні посиленої окислювальної модифікації SH-груп (рис. 3, Б), яка призводить до порушення рівноваги між сульфгідрильними і дисульфідними групами білків. Опромінення тварин малими дозами, що передувало трансплантації

пухлини, зумовлювало інтенсифікацію окислення нерозчинних в 0,05 М Na-фосфатному буфері (рН 11,5) білків пухлинних клітин на латентній та логарифмічній стадіях росту пухлини, і на 14-у добу експерименту рівень окислених SH-груп і карбонільних похідних в 2,2 і 1,5 раза відповідно перевищує показники, встановлені для неопромінених тварин (рис. 3, А, Б). Імовірно акумуляція модифікованих протеїнів пов'язана з високою інтенсивністю генерації АФК у злоякісних клітинах. Проте на термінальних етапах (21-а доба експерименту) пухлинного росту достовірних відмінностей щодо окислювального пошкодження досліджуваних мітохондріальних білків у групі попередньо опромінених і неопромінених пухлиноносіїв не виявлено.

Отже, встановлені нами зміни фракційного складу досліджуваних мітохондріальних білків можуть бути пов'язані з окислювальною модифікацією протеїнів з імовірним подальшим руйнуванням їх мітохондріальними протеїназами або наслідком фрагментації мтДНК. Показані відмінності у групах неопромінених і опромінених пухлиноносіїв дозволяють стверджувати, що вплив низькодозового опромінення виявляється тільки на початкових етапах його післядії, а надалі рівень окислювального пошкодження біомолекул мітохондрій визначається умовами розвитку новоутворення.



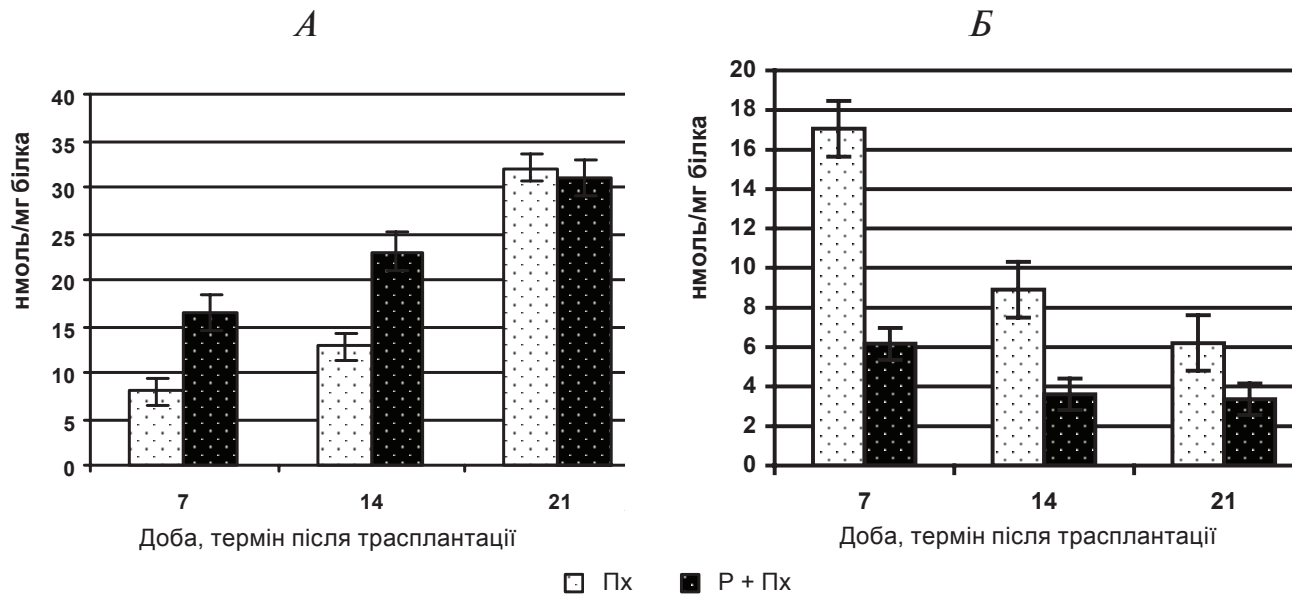


Рис. 3. Рівень карбонільних похідних (А) і SH-груп (Б) мітохондріальних білків, нерозчинних в 0,05 М Na-фосфатному буфері (рН 11,5), трансформованої тканини попередньо опромінених пухлиноносців

**ВЛИЯНИЕ НИЗКИХ ДОЗ ИОНИЗИРУЮЩЕГО ОБЛУЧЕНИЯ НА ФРАКЦИОННЫЙ СОСТАВ МИТОХОНДРИАЛЬНЫХ БЕЛКОВ И мтДНК КАРЦИНОМЫ ГЕРЕНА**

М. М. Марченко, Г. П. Копыльчук, О. Н. Волощук

Черновицкий национальный университет, Украина; e-mail: oxbm@mail.ru

В работе исследовано влияние предварительного облучения низкими дозами радиации на фракционный состав митохондриальных белков, нерастворимых в 0,05 М Na-фосфатном буфере (рН 11,5), уровень их окислительной модификации и степень фрагментации митохондриальной ДНК (мтДНК) карциномы Герена крыс в процессе развития онкозаболевания. Показано, что влияние низких доз ионизирующей радиации наиболее выражено на начальных этапах опухолевого процесса. Установлено, что развитие злокачественного новообразования сопровождается изменением фракционного состава митохондриальных белков, нерастворимых в 0,05 М Na-фосфатном буфере (рН 11,5), а именно снижением интенсивности окраски полос в области молекулярных масс 32–66 кДа и усилением гетерогенности в области молекулярных масс от 8 до 24 кДа. Изменение фракционного состава исследуемых митохондриальных белков про-

исходит на фоне интенсификации их окислительной модификации, а именно накопления карбонильных производных и снижения содержания свободных SH-групп, а также интенсификации фрагментации мтДНК.

Ключевые слова: карцинома Герена, предварительное фракционированное облучение, низкие дозы радиации, митохондриальная ДНК, митохондриальные белки, окислительная модификация мтДНК.

**EFFECT OF LOW DOSES OF IONIZING RADIATION ON THE FRACTIONAL CONTENT OF MITOCHONDRIAL PROTEINS AND mtDNA OF GUERIN'S CARCINOMA**

М. М. Marchenko, G. P. Kopylchuk, O. M. Voloschuk

Chernivtsy National University, Ukraine; e-mail: oxbm@mail.ru

**Summary**

The work is devoted to investigation of the influence of low doses of preliminary radiation on the fraction content, and oxidizing modification of mitochondrial proteins, unsolvable in 0.05 M sodium-phosphate buffer (11,5), and mtDNA fragmentation. That low-dose irradiation influence mostly manifests itself on the initial stages of tumor growth. It was established that tumor development is accompanied with the changes of mitochondrial

proteins fraction content. These changes occurred on the intensive oxidizing modification background of the proteins under study and mtDNA fragmentation.

**Key words:** Guerin's carcinoma, preliminary fractionating irradiation, low-dose irradiation, mtDNK, mitochondrial proteins, mtDNA oxidizing modification.

1. *Bonner W. M.* // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2003. – **100**, N 9. – P. 4973–4975.
2. *Tubiana M.* // Radiat. Envir. Biophys. – 2000. – **39**, N 1. – P. 3–16.
3. *Андреев А. Ю., Кушнарєва Ю. Е., Старков А. А.* // Биохимия. – 2005. – **70**, вып. 2. – С. 246–264.
4. *Виноградов А. Д., Гривенникова В. Г.* // Биохимия. – 2005. – **70**, вып. 2. – С. 150–159.
5. *Миронова Н. Г., Древаль В. И., Сичевская Л. В., Загородняя Е. В.* // Радиц. биол. Радиоэкология. – 2000. – **40**, № 2. – С. 138–141.
6. *May A., Bohr V. A.* // Biochem. Biophys. Res. Commun. – 2000. – **269**, N 2. – P. 433–437.
7. *Wilding C. S., Cadwell K., Tawn E. J. et al.* // Radiat. Res. – 2006. – **165**. – P. 202–207.
8. *Береговская Н. Н., Савич А. В.* // Радиц. биол. Радиоэкология. – 1994. – **34**, вып. 3. – С. 349–351.
9. *Гжегоцький М. Р., Клес О. В.* // Эксперим. фізіол. біохім. – 2005. – № 3. – С. 30–37.
10. *Лю М. Б., Подобед И. С., Едыгенова А. К., Лю Б. Н.* // Успехи совр. биол. – 2005. – **125**, № 2. – С. 179–188.
11. *Шабалина И. Г., Колосова Н. Г., Гришкова А. Ю. и др.* // Биохимия. – 1995. – **60**, вып. 12. – С. 2045–2052.
12. *Kitagawa Y., Sugimoto E.* // Biochemie. – 1980. – **88**, N 3. – P. 689–693.
13. *Laemmli U. K.* // Nature. – 1970. – **227**. – P. 680–685.
14. *Дубинина Е. Е., Бурмистров С. О., Ходов Д. А., Поротов И. Г.* // Вопр. мед. химии. – 1995. – **41**, № 1. – С. 24–26.
15. *Murphy M. E., Kehrер J. P.* // Biochem. J. – 1989. – **260**. – P. 359–364.
16. *Lowri O. H., Rosenbrough N. J., Farr A. L.* // J. Biol. Chem. – 1951. – **123**, N 1. – P. 265–273.
17. *Palva T. K., Palva E. T.* // FEBS Letters. – 1985. – **192**. – P. 267–270.
18. *Hegler J., Bittner D., Voiteux S., Epe B.* // Carcinogenesis. – 2003. – **14**. – P. 2309–2312.
19. *Levine R. L., Stadtman E. R.* // Exp. Gerontol. – 2001. – **36**, N 9. – P. 1495–1502.
20. *Пасечник И. Н.* // Вестн. интенсивной терапии. – 2001. – № 4. – С. 3–9.

Отримано 05.02.2008