

М. М. Марченко, Г. П. Копильчук, О. В. Кеца

**Білковий склад мікросомної фракції печінки
попередньо опромінених щурів з карциною Герена***(Представлено академіком НАН України Д. О. Мельничуком)*

We investigate the protein fractional content in a rat liver microsomal fraction at different stages of Guerin's carcinoma growth and after the influence of low-dose irradiation. The previous radiation does not influence the electrophoretical distribution of high-molecular proteins in liver microsomes of rats with Guerin's carcinoma, but determines the cytochrome P-450 distribution in the latent period of oncogenesis. On terminal stages of Guerin's carcinoma growth in the irradiated organism, the full degradation of cytochrome P-450 with molecular weight 54 kDa is observed.

У наш час інтенсивно вивчаються зміни ліпідного складу мікросомних мембран за дії низьких доз радіації [1], тоді як дія іонізуючого опромінення на білковий склад мікросом печінки організму, в якому розвивається пухлинний зародок, вивчена недостатньо [2, 3]. Дослідження поліморфізму білків, у тому числі цитохромів Р-450, у мікросомній фракції печінки організму-пухлиноносія відкриває нові можливості для діагностики онкозахворювань, які можуть бути викликані порушенням як експресії генів цитохромів Р-450 (СУР), так і функціонування цитохром-Р-450-залежного метаболізму ксенобіотиків [4, 5].

Ми ставили собі за мету дослідити зміни білкового складу мікросомної фракції печінки щурів з карциною Герена, трансплантованою після хронічного опромінення щурів малими дозами.

Дослідження проводились на білих безпородних щурах-самках масою 130–150 г. Тварини були поділені на групи: I — інтактні тварини (контроль); II — опромінені тварини; III — щури, яким проводили трансплантацію карциноми Герена за попередньо опрацьованою методикою (дослідний контроль) [6]; IV — тварини, яким по закінченні 7-добового опромінення трансплантували пухлинні клітини.

Опромінення проводили перед трансплантацією пухлини протягом 7 діб щодобово в дозі $36,12 \cdot 10^{-4}$ Кл/кг (13 сГр) на рентгенівській діагностичній установці 12П6 ("Lachema", Чехія). Тварин опромінювали групами при вільному утриманні в клітці. Евтаназію здійснювали під легким ефірним наркозом на 1-шу, 7-му, 14-ту та 21-шу добу після припинення дії радіації.

Мікросомну фракцію виділяли з печінки щурів методом диференційного центрифугування [7]. Осад мікросом, який використовували для електрофоретичного вивчення білків, ресуспендували в 0,05 М трис-ацетатному буфері, що містив 0,1 мМ ЕДТА і 20% гліцерол, після чого проби обробляли SDS та β -меркаптоетанолом [8]. Концентрацію білків у мікросомній фракції визначали за методом Лоурі [9].

Електрофорез мікросомних білків проводили в поліакриламідному гелі (ПААГ) за методом Леммлі [10], адаптованому для електрофорезу на пластинах гелю. Пластини (13 × 12 × 0,1 см) містили 3% концентруючий ПААГ і 7,5% розділяючий ПААГ. Проби, які наносили на пластинах гелю, містили 50 мкг/мл білка. Як маркери використовували препарати білків:

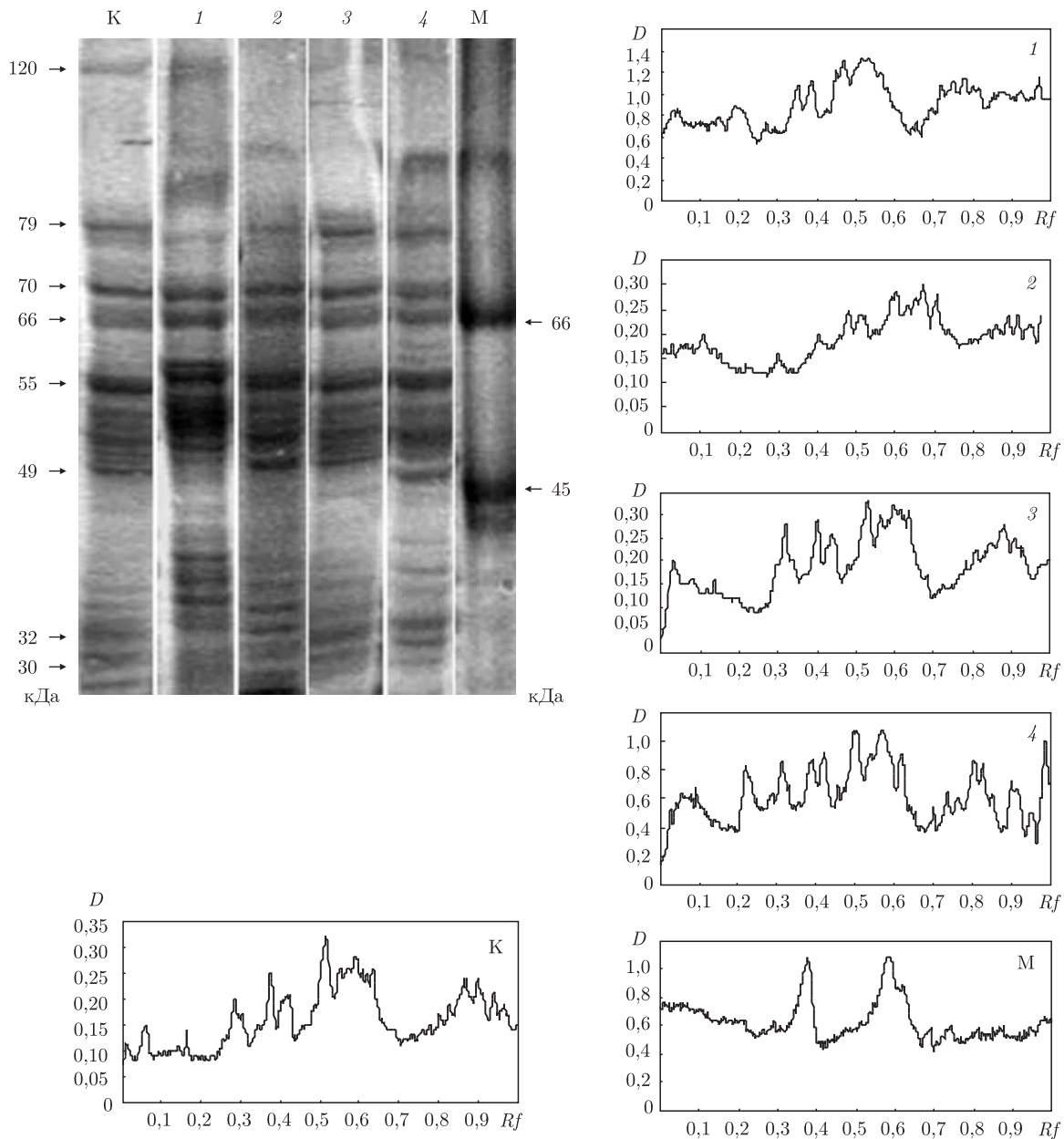


Рис. 1. Електрофореграми та електрофоретичні профілі білків мікросомної фракції печінки щурів, що зазнали дії фракціонованого рентгенівського опромінення: К — контроль (тут і на рис. 2); 1, 2, 3, 4 — на 1-шу, 7-му, 14-ту, 21-шу доби після опромінення відповідно; М — маркерний препарат

овальбумін (Mr 45 000) та бичачий сироватковий альбумін (Mr 66 000). Електрофоретичне розділення білків проводили при постійній напрузі 200 В протягом 3 год. Після електрофорезу гелі фіксували в суміші ізопропанол — ацетат — вода у співвідношенні 25 : 10 : 65 протягом 1–2 год, а потім забарвлювали 0,05% розчином Coomassie R-250 (“Reanal”, Угорщина) у тому ж розчиннику. Гелі відмивали 10% ацетатом у 10% розчині ізопропанолу, а потім сканували на апараті “GelDoc 2000” та аналізували з використанням програми “Quantity One” (“Bio-Rad”, США).

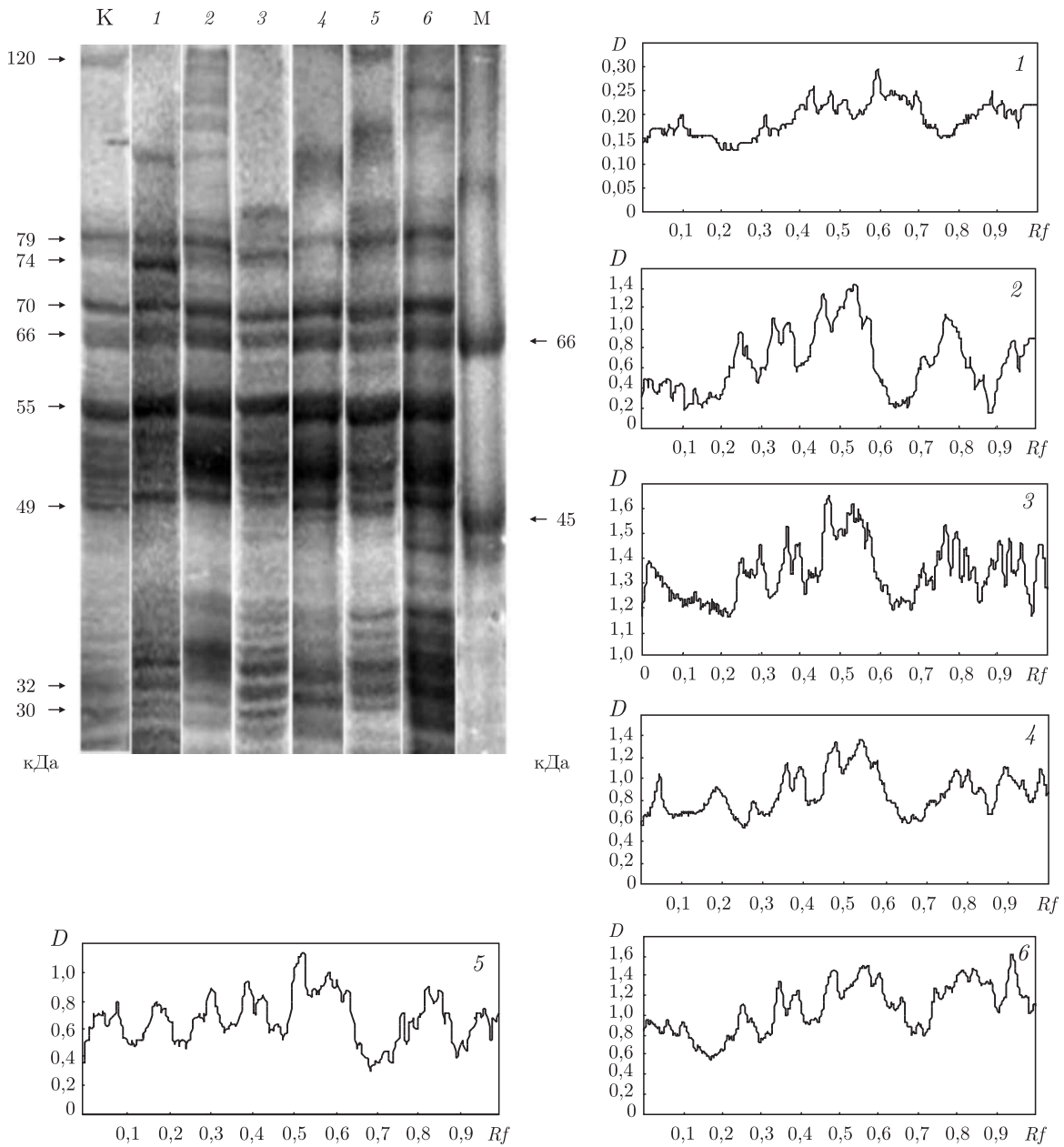


Рис. 2. Електрофореграми та електрофоретичні профілі білків мікосомної фракції печінки попередньо опромінених та неопромінених щурів з карциномою Герена:

1, 3, 5 — на 7-му, 14-ту, 21-шу доби після трансплантації пухлини попередньо опроміненим тваринам відповідно; 2, 4, 6 — щури-пухлиноносії на 7-му, 14-ту, 21-шу доби після трансплантації пухлини відповідно; М — маркерний препарат

Аналіз електрофоретичних спектрів білків мікосомної фракції печінки контрольних тварин дозволив виявити сім білкових смуг з мол. масами 45–60 кДа (рис. 1). Вважають, що в цих межах мол. мас локалізовані смуги ізоформ цитохрому Р-450 [5, 8, 11, 12]. Слід зазначити, що ізоформи цитохрому Р-450, які відрізняються один від одного менше ніж на 1 кДа, при цьому не розділяються, тому в одній смузі може бути локалізовано кілька ізоформ даного білка [13].

Попереднє опромінення щурів малими дозами протягом 7 діб призводить до появи нової білкової фракції з мол. масою 56,6 кДа в мікосоммах печінки (див. рис. 1). Водночас спостерігається виснаження смуг з мол. масами 49 та 79 кДа. Такий електрофоретичний профіль може відображати розподіл ізоформ цитохрому Р-450 та білка трансферину відповідно [5]. Характерною є поява низькомолекулярних білків 43, 41 та 39 кДа. Отже, у ранні періоди після опромінення електрофоретичні профілі збагачені низькомолекулярними білковими фракціями і характеризуються повною відсутністю високомолекулярних білкових агрегатів.

У міру віддалення від терміну опромінення — 7-ма — 21-ша доби експерименту білковий спектр мікосомної фракції печінки наближається до контрольних показників (див. рис. 1).

Дослідження фракційного розподілу мікосомних білків у процесі онкогенезу показало, що латентний період росту карциноми Герена характеризується появою білкових агрегатів з мол. масами 90, 92 та 99 кДа (рис. 2).

Подібні зміни у складі білків мікосом печінки відбуваються і в групі попередньо опромінених щурів-пухлиноносіїв: у них утворюються білкові агрегати з мол. масами 90 та 74 кДа (див. рис. 2). Поряд з цим в опромінених щурів-пухлиноносіїв спостерігається виснаження смуги, яка відповідає фракції білків з мол. масою 79 кДа, та відмічаються зміни в ізоферментному складі цитохрому Р-450. Так, в опромінених пухлиноносіїв меншою мірою виражена смуга ізоформи цитохрому Р-450 з мол. масою 51 кДа, однак наявна ізоформа цитохрому Р-450 з мол. масою 54 кДа, яка повністю відсутня у неопромінених щурів-пухлиноносіїв (див. рис. 2).

Отже, попереднє опромінення не впливає на електрофоретичний розподіл високомолекулярних білків і є визначальним для ізоформ цитохрому Р-450 в даний період онкогенезу.

У логарифмічний період росту карциноми Герена в печінці попередньо опромінених пухлиноносіїв спостерігається утворення високомолекулярних фрагментів білків 84 та 77,8 кДа, які відсутні в групі неопромінених щурів з карциномою Герена (див. рис. 2). Поява цих фрагментів, можливо, якоюсь мірою зумовлена інгібуючою дією радіації на ферментні системи (тіоредоксинредуктазу та глутатіонредуктазу), які здатні відновлювати окиснені дисульфідні містки, і тим самим знижувати можливість утворення білкових агрегатів [14].

У стаціонарну фазу онкогенезу в опромінених щурів-пухлиноносіїв на електрофореграмах повністю відсутня смуга з мол. масою 54 кДа, яка характерна для цитохрому Р-450, однак на попередніх етапах експерименту виявлялася (див. рис. 2), що наближає електрофоретичний спектр ізоформ цитохрому Р-450 до відповідних спектрів дослідного контролю у віддаленні терміни після опромінення.

Отже, опромінення організму, що передувє трансплантації карциноми Герена призводить до зміни ізоферментного спектра цитохрому Р-450 мікосом печінки на початкових етапах онкогенезу і до повної деградації цитохрому Р-450 з мол. масою 54 кДа в опроміненому організмі пухлиноносія на термінальних етапах онкогенезу.

1. Артамонов М. В., Жуков О. Д., Горідько Т. М. та ін. Вплив N-стеароїлетаноламіну на ліпідні компоненти мікосом печінки та серця за дії на щурів іонізуючого випромінювання // Укр. біохім. журн. – 2003. – **75**, № 4. – С. 81–92.
2. Kerbovnik M., Reiter R. J. Antioxidative effects of melatonin in protection against cellular damage caused by ionizing radiation // Proc. Soc. Exp. Biol. and Med. – 2000. – **225**. – P. 9–22.
3. Ness G. C., Pendleton L. C., McCreery M. J. Target size analysis by radiation inactivation: the use of free radical scavengers // Exp. Biol. Med. – 2005. – **230**. – P. 455–463.

4. Глушакова Л. Г., Максимчук О. В., Данко И. М. и др. Влияние факторов чернобыльской зоны отчуждения на содержание цитохрома P-450 в микросомах печени мышей // Укр. біохім. журн. – 2000. – **72**, № 6. – С. 63–67.
5. Канаева И. П., Петушкова П. Г., Лохов П. Г. и др. Исследование микросом клеток печени мыши методами протеомного анализа // Биомед. химия. – 2004. – **50**, № 4. – С. 367–375.
6. Марченко М. М., Копильчук Г. П., Григор'єва О. В. Активність цитоплазматичних протеаз пухлинної тканини щурів з трансплантованою карциномою Герена за дії лікувальних засобів різної природи // Доп. НАН України. – 2000. – № 3. – С. 192–195.
7. Schenkman J. B., Cinti D. L. Preparation of microsomes with Calcium // Meth. Enzymol. – 1978. – **52**, pt. C. – P. 83–89.
8. Haugen D. A., Coon M. J. Induction of multiple forms of mouse liver cytochrome P-450 // J. Biol. Chem. – 1976. – **251**, No 6. – P. 1817–1827.
9. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. Protein measurement with the folin phenol reagent // J. Biol. Chem. – 1951. – **193**, No 1. – P. 265–275.
10. Laemmli U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 // Nature. – 1970. – **227**. – P. 680–685.
11. Канаева И. П., Петушкова Н. А., Лохов П. Г. et al. Study of the mouse liver microsomes by the methods of proteome analysis // Biomed. Khim. – 2004. – **50**, No 4. – P. 367–375.
12. Heinemann F. S., Ozols J. isolation and structural analysis of microsomal membrane proteins // Front. Biosci. – 1998. – **3**. – P. 483–493.
13. Довгий А. И., Андрианов Н. В., Арчаков А. И. Влияние амидопирина на скорость распада изоформ цитохрома P-450 // Бюл. эксперим. биологии и медицины. – 1986. – **101**, № 2. – С. 167–170.
14. Holmgren A., Johansson C., Berndt C. et al. Thiol redox control via thioredoxin and glutaredoxin systems // Biochem. Soc. Trans. – 2005. – **33**. – P. 1375–1377.

Чернівецький національний університет
ім. Юрія Федьковича

Надійшло до редакції 27.10.2006