

## ДИНАМІКА СПІВВІДНОШЕННЯ УБІХІНОН/УБІХІНОЛ В МІТОХОДРІАЛЬНІЙ ФРАКЦІЇ ТРАНСФОРМОВАНОЇ ТКАНИНИ ЗА УМОВ НИЗЬКОДОЗОВОГО ОПРОМІНЕННЯ

О.М. ВОЛОЩУК, М.М. МАРЧЕНКО, Л.А. БІНДЯК

*Чернівецький національний університет імені Юрія Федьковича, вул. Коцюбинського, 2, м. Чернівці, 58012  
e-mail: oxbm@mail.ru*

*Досліджено інтенсивність генерації гідроксильного радикалу, динаміку вмісту загального, окисленого та відновленого убіхінону, а також співвідношення убіхінон/убіхінол у мітохондріальній фракції трансформованої тканини в процесі росту карциноми Герена за умов попереднього фракціонованого опромінення малими дозами радіації. Встановлено, що у динаміці росту карциноми Герена спостерігається інтенсифікація продукування гідроксильного радикалу, що супроводжується зниженням вмісту загального убіхінону на фоні перерозподілу його окисленої та відновленої форми з тенденцією до підвищення співвідношення убіхінон/убіхінол з максимумом на термінальних етапах онкогенезу. Попереднє низькодозове опромінення пухлиноносіїв призводить до посилення продукування гідроксильного радикалу на початкових етапах росту карциноми Герена з тенденцією до підвищення вмісту досліджуваних форм убіхінону та співвідношення убіхінон/убіхінол, що може лежати в основі порушення антиоксидантного захисту біомолекул мітохондрій від АФК за умов онкогенезу та опромінення малими дозами радіації.*

*Ключові слова: гідроксильний радикал, убіхінон/убіхінол, карцинома Герена, малі дози радіації.*

**Вступ.** Мітохондрії містять численні редокс-переносники і центри, потенційно здатні до одноелектронного відновлення кисню до радикалів супероксид аніона, попередника інших активних форм кисню (АФК), в тому числі найбільш реакційно здатного гідроксильного радикалу (ОН) (Андреев и др., 2005, Зоров и др., 2005). Висока окислювальна здатність АФК створює істотну загрозу для редокс-чутливих компонентів клітини. Скевенджером вільних радикалів у мітохондріях є убіхінон, що вважається одним із найбільш важливих ендогенних антиоксидантів і забезпечує функціонування мітохондрій в умовах окисного стресу (Донченко та ін., 2005, Корягин и др., 2002, Battino et al., 2003). Важливим показником стану системи антиоксидантного захисту організму є співвідношення убіхінон/убіхінол (Ключников С.О., Гнетнева Е.С., 2007).

Метою нашої роботи стало вивчення інтенсивності генерації гідроксильного радикалу, вмісту загального, окисленого та відновленого убіхінону, а також співвідношення убіхінон/убіхінол у мітохондріальній фракції трансформованої тканини в процесі росту карциноми Герена за умов попереднього опромінення малими дозами радіації.

**Матеріали та методи.** Дослідження проводили на білих нелінійних щурах масою 110-130 г та віком 2,5-3 місяці, яких утримували на стандартному раціоні віварію. Роботу з тваринами проводили із дотриманням положень “Загальних етичних принципів експериментів на тваринах”, ухвалених Першим Національним конгресом із біое-

тики. Тварин поділили на групи: I – щури з трансплантованою карциномою Герена (П), II – опромінені щури, яким на 1-у добу після припинення опромінення трансплантували карциному Герена (Р+П). Трансплантацію карциноми Герена проводили шляхом підшкірного введення 0,5 мл 30% суспензії ракових клітин в ізотонічному розчині натрію хлориду. Штам пухлини наданий Інститутом експериментальної патології, онкології і радіобіології ім. Р.С. Кавецького НАН України.

Опромінення проводили протягом семи діб щоденно в дозі  $36,12 \cdot 10^{-4}$  Кл/кг на рентгенівській діагностичній установці 12П6 („Lachema”, Чехія) при потужності дози  $2,58 \cdot 10^{-4}$  Кл/кг (0,93 сГр/с), напрузі 80 кВ, силі струму 40 мА, шкірно-фокусній відстані 40 см з використанням фільтрів 0,5 мм Cu.

Тривалість експерименту становила 21 добу. Евтаназію під легким ефірним наркозом із застосуванням методу цервікальної дислокації здійснювали на 7 (латентна стадія пухлинного росту), 14 (логарифмічна стадія пухлинного росту), 21 (термінальна стадія пухлинного росту) добу після імплантації пухлини.

Мітохондріальну фракцію з гомогенату пухлинної тканини отримували методом диференційного центрифугування (Шабалина и др., 1995). Всі операції проводили при 0-3<sup>0</sup>С.

Вміст білка визначали за Лоурі (Lowry, 1951). Генерацію гідроксильного радикалу визначали за (Ткаченко та ін., 2005). Убіхінон з мітохондріальної фракції виділяли шляхом швидкої екстрак-

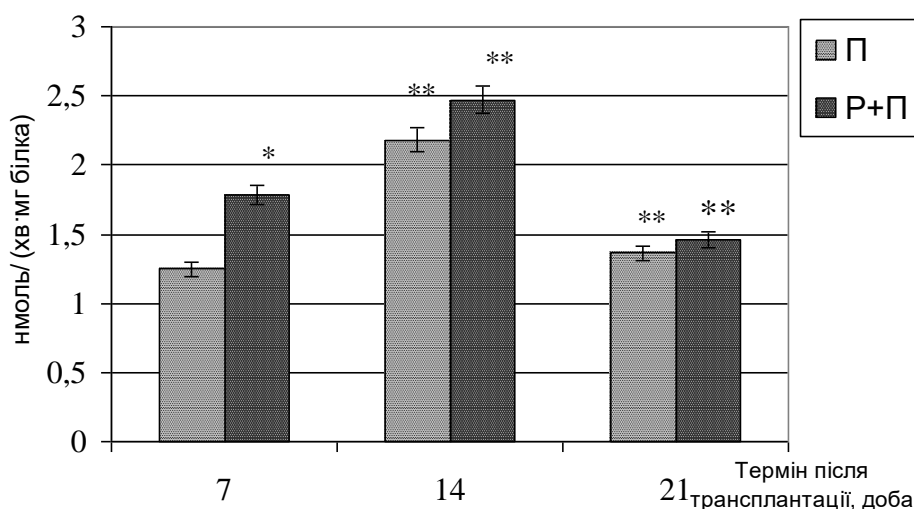
ції сумішшю реактивів гептан:метанол у співвідношенні 1:1 (Чернухіна та ін., 1974). Вміст загального та окисленого убіхінону визначали спектрофотометрично при  $\lambda=275$  нм і розраховували, враховуючи коефіцієнт молярної екстинції убіхінону  $12,25 \text{ Мм}^{-1} \times \text{см}^{-1}$ . Вміст відновленого убіхінону визначали за різницею вмісту загального та окисленого убіхінону. Вміст різних форм убіхінону виражали в мкмоль/мг білка мітохондрій. Співвідношення убіхінон/убіхінол виражали у %. Статистичну обробку даних проводили з використанням критерію Стьюдента.

**Результати й обговорення.** Результати проведених досліджень показали, що прогресуючий перебіг онкозахворювання супроводжується підвищенням інтенсивності продукування гідроксильного радикалу. Встановлено, що максимальна швидкість генерації ОН спостерігається на 14 добу пухлинного росту, і в цей період у 1,7 рази перевищує показники, отримані на 7 добу онкогенезу (рис. 1). Посилення генерації АФК в пухлині в цей період з одного боку проявляє токсичну дію на внутрішньоклітинні біомолекули, а з іншого – веде до послаблення поверхневих структур клітини і міжклітинних контактів, тобто до змін, які причетні до інвазивності та метастазування неоплазми (Лю та ін., 2005). Водночас в термінальний період пухлинного росту рівень генерації гідроксильного радикалу знижується. Оскільки термінальні етапи онкогенезу супроводжуються виникненням внутрішньоклітинної гіпоксії, а рівень генерації АФК прямо залежить від концентрації кисню у клітині (Андреев и др., 2005), то,

ймовірно, саме цей процес лежить в основі встановленого гальмування інтенсивності генерації вільних радикалів.

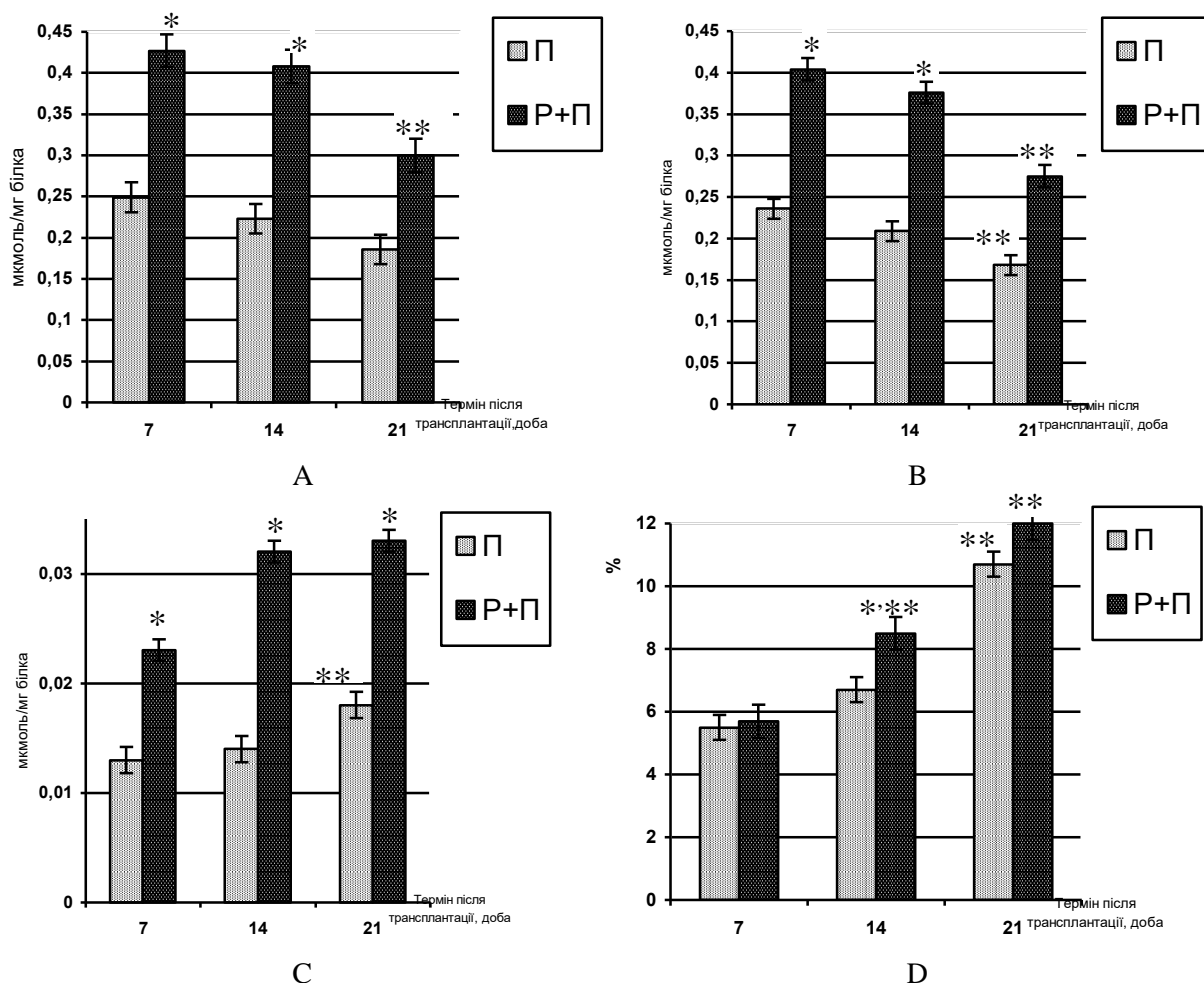
Попереднє опромінення малими дозами радіації призводило до інтенсифікації генерації гідроксильного радикалу в динаміці росту неоплазми зі збереженнями тенденції, встановленої для неопромінених пухлиноносіїв, на термінальних етапах онкогенезу.

Посилення продукування в динаміці росту карциноми Герена як гідроксильного, так і, як було показано нами раніше, супероксидного (Марченко та ін., 2008) радикалів у мітохондріальній фракції трансформованої тканини, буде призводити до окислювального пошкодження біомолекул самих мітохондрій, і як наслідок, зумовлювати порушення функціонування основних органел енергетичного обміну з переключенням системи енергозабезпечення пухлинних клітин на гліколітичний тип (Лю, 2006). Основним із механізмів зниження вмісту вільних радикалів у мітохондріях є підвищення ефективності та надійності функціонування дихального ланцюга, в якому активну участь бере убіхінон – кофермент Q (КоQ) (Crane, 2001). Водночас убіхінон є сквенджером АФК і розглядається як один із найбільш важливих ендогенних антиоксидантів, оскільки він синтезується в самому організмі та, більше того, завдяки властивостям метаболізації постійно і самостійно відновлює свою антиоксидантну активність: із окисленої форми (убіхінон) здатний переходити у відновлену форму (убіхінол) (Аронов, 2004, Ключников, Гнетнева, 2008).



**Рис.1.** Інтенсивність генерації гідроксильного радикалу в мітохондріальній фракції трансформованої тканини у динаміці росту карциноми Герена  
Примітка (тут і надалі): \* - вірогідна різниця порівняно з неопроміненими пухлиноносійми; \*\* - вірогідна різниця порівняно з попередньою стадією пухлинного росту.

**Fig. 1.** The intensity of hydroxyl radical generation in mitochondrial fraction of transformed tissue in the dynamics of Guerin's carcinoma growth  
Note (hereinafter referred to): \* - significant difference compared to unirradiated animals with tumor \*\* - significant difference compared to the previous stage of tumor growth.



**Рис. 2.** Вміст загального (А), відновленого (В), окисленого (С) убіхінону та співвідношення убіхінон/убіхінол (D) в мітохондріальній фракції карциноми Герена попередньо опромінених пухлиноносців

**Fig. 2.** The content of total (A), reduced (B), oxidised (C) ubiquinone and ubiquinone/ubiquinol ratio (D) in the mitochondrial fraction of Guerin's carcinoma in preliminary irradiated rats with tumor

Результати проведених досліджень показали, що у мітохондріальній фракції карциноми Герена у динаміці росту неоплазми спостерігається тенденція до зниження вмісту загального убіхінону. На термінальних етапах пухлинного генезу вміст убіхінону нижчий у порівнянні з латентною стадією у 1,4 рази.

Зниження вмісту загального убіхінону в цей період супроводжується перерозподілом вмісту його відновленої і окисленої форми (рис. 2 А, В, С). Так, на термінальних етапах пухлинного росту спостерігається зниження вмісту відновленого убіхінону в 1,4 рази на фоні достовірного підвищення вмісту його окисленої форми. Враховуючи, що активним антиоксидантом насамперед є відновлена форма убіхінону – убіхінол (QH<sub>2</sub>) (Crane, 2001), то зниження вмісту відновленої форми свідчить про порушення антиоксидантної функції убіхінону. Саме відновлена форма убіхінону здатна взаємодіяти з АФК із проміжним утворенням напіввідновленої форми убіхінону – убісеміхінонового радикала (QH), відновлення якого відбувається або в мітохондріальному ланцюгу транспорту електронів, або за участю вітаміну С (Донченко и др., 2005).

Зниження вмісту відновленого убіхінону в стаціонарний період росту пухлини в організмі буде призводити до зниження ймовірності передачі ним електронів на цитохром *b* дихального ланцюга.

Як один із важливих показників стану антиоксидантної системи організму розглядається співвідношення убіхінон/убіхінол (Ключников, Гнетнева, 2007). Результати проведених досліджень показали, що за умов встановленого нами посиленого продукування АФК, в динаміці онкогенезу спостерігається тенденція до підвищення співвідношення убіхінон/убіхінол з максимумом на 21 добу пухлинного росту (рис. 2 D).

Враховуючи, що убіхінон знаходиться у ліпідному бішарі внутрішньої мембрани мітохондрій, забезпечуючи перенесення електронів від I та II комплексів дихального ланцюга на атом заліза цитохрому *b*, відновлюючи останній, то, ймовірно, підвищення співвідношення убіхінон/убіхінол в динаміці росту карциноми Герена відображає порушення антиоксидантної активності убіхінону та процесів клітинного дихання мітохондрій.

Попереднє опромінення малими дозами уже на латентній стадії росту карциноми Герена призводить до підвищення вмісту загального убіхінону в 1,7 рази, що супроводжується підвищенням вмісту окисленої форми убіхінону на фоні зниження вмісту його відновленої форми (рис. 3, 4) зі збереженням тенденції, встановленої для неопромінених пухлиноносіїв. Водночас змінюється співвідношення убіхінон/убіхінол. Попереднє опромінення пухлиноносіїв зумовлює достовірне підвищення співвідношення убіхінон/убіхінол лише на 14 добу експерименту (рис. 2 D). В цей період співвідношення убіхінон/убіхінол зростає на 27% порівняно з неопроміненими пухлиноносійми, проте на подальших етапах онкогенезу достовірних відмінностей у експериментальних групах тварин не виявлено.

**Висновки.** Отже, у динаміці росту карциноми Герена спостерігається інтенсифікація продукування гідроксильного радикалу, що супроводжується зниженням вмісту загального убіхінону на фоні перерозподілу його окисленої та відновленої форми з тенденцією до підвищення співвідношення убіхінон/убіхінол з максимумом на термінальних етапах онкогенезу. Попереднє низькодозове опромінення пухлиноносіїв призводить до посилення продукування гідроксильного радикалу на початкових етапах росту карциноми Герена з тенденцією до підвищення вмісту досліджуваних форм убіхінону та співвідношення убіхінон/убіхінол порівняно з неопроміненими пухлиноносійми, що може лежати в основі порушення антиоксидантного захисту біомолекул мітохондрій від АФК за умов онкогенезу та опромінення малими дозами радіації.

#### Список літератури:

1. Андреев А.Ю. Метаболизм активных форм кислорода в митохондриях / А.Ю. Андреев, Ю.Е. Кушнарева, А.А. Старков // Биохимия. – 2005. – Т.70, вып. 2. – С. 246–260.
2. Зоров Д.Б. Друзья или враги. Активные формы кислорода и азота / Д.Б. Зоров, С.Ю. Банникова, В.В. Белоусов и др. // Биохимия. – 2005. – Т.70, вып. 2. – С. 265–276.
3. Донченко Г.В. Біохімічні властивості і функціональна роль убіхінону (CoQ). Практичні аспекти застосування / Г.В. Донченко, О.Б. Кучменко, Д.М. Петухов // Укр. біохім. журн. – 2005. – Т. 77, № 5. – С. 24–36.

#### THE DYNAMICS OF UBIQUINONE / UBIQUINOL RATIO IN MITOCHONDRIAL FRACTION OF TRANSFORMED TISSUE UNDER CONDITION OF LOW DOSES IRRADIATION

O.M. Voloshchuk, M.M. Marchenko, L.A. Bindyak

*The intensity of hydroxyl radical generation, dynamics of the total, oxidized and reduced ubiquinone content, as well as ubiquinone/ubiquinole correlation in the mitochondrial fraction of transformed tissue in the process of Guerin's carcinoma tumor growth under the conditions of preliminary low-level fractional irradiation were researched. It is found, that during Guerin's carcinoma tumor growth dynamics the intensification of hydroxyl radical generation is observed and accompanied with the decrease of the total ubiquinone content against the background redistribution of its reduced and oxidized forms with the tendency to increase of ubiquinone/ubiquinole correlation with the peak value at the terminal stages of oncogenesis. The preliminary low-level irradiation of tumor carriers leads to intensification of the hydroxyl radical production on the early stages of Guerin's carcinoma tumor growth with the tendency to increase of ubiquinone forms content and ubiquinone/ubiquinole correlation, that can underlie the disturbance of the antioxidative defense of mitochondrial biomolecules against ROS in the conditions of oncogenesis and low-level irradiation.*

*Key words: hydroxyl radical, ubiquinone/ubiquinole, Guerin's carcinoma, low dose fractional irradiation*

*Отримано редколегією 30.08.2011*

4. Корягин А.С. Влияние убихинона-10 на систему крови при радиационном облучении крыс / А.С. Корягин, Е.В. Крылова, Л.Д. Лукьянова // Булл. эксперим. биол. мед. – 2002. – Т. 133, № 6. – С. 650–652.
5. Battino M.D. Coenzyme Q<sub>10</sub>, antioxidant status and ApoE isoforms / M.D. Battino, S.N. Giunta, L.V. Galezzi // Biofactors. – 2003. – Vol. 18, № 1-4. – P. 299-305.
6. Ключников С.О. Убихинон (коэнзим Q<sub>10</sub>). Клинические аспекты / С.О. Ключников, Е.С. Гнетнева // Лечащий врач. – 2007. – № 6. – С. 86–87.
7. Шабалина И.Г. Активность окислительного фосфорилирования F<sup>0</sup>F<sup>1</sup>-АТФ-азы и содержание цитохромов митохондрий печени крыс с врожденным повышением способности радикалообразования / И.Г. Шабалина, Н.Г. Колосова, А.Ю. Гришкова // Биохимия. – 1995. – Т. 60, вып. 12. – С. 2045 – 2052.
8. Lowri O.H. Protein measurement With Folin phenol reagent / O.H. Lowri, N.J. Rosenbrough, A.L. Farr // J. Biol. Chem. – 1951. – Vol. 123, № 1. – P. 265 – 273.
9. Ткаченко М.М. Вікові особливості змін скорочувальних судинних реакцій і вміст вільних радикалів кисню та метаболітів оксиду азоту у мишей лінії BALB/c за умов перебування у зоні відчуження / М.М. Ткаченко, В.Ф. Сагач, О.В. Базілюк та ін. // Фізіол. журн. – 2005. – Т. 51, № 3. – С. 32–40.
10. Чернухіна Л.О. Вміст і розподіл убіхінону та убіхроменолу в неомылованій фракції субклітинних структур печінки нормальних і авітамінозних щурів / Л.О. Чернухіна, Г.В. Донченко, В.М. Коваленко // Укр. біохім. журн. – 1974. – Т. 46, № 4. – С. 514–518.
11. Лю М.Б. Кислородно-перекисный механизм канцерогенеза и модификация ДНК / М.Б. Лю, И.С. Подобед, А.К. Едыгенова, Б.Н. Лю // Успехи совр. биол. – 2005. – Т. 125, № 2. – С. 179–188.
12. Марченко М.М. Вплив малих доз іонізуючого випромінювання на фракційний склад мітохондріальних білків і мтДНК карциноми Герена / М.М. Марченко, Г.П. Копильчук, О.М. Волощук // Укр. біохім. журн. – 2008. – Т. 80, № 4. – С. 114 – 119.
13. Лю Б.Н. Роль митохондрий в развитии и регуляции уровня окислительного стресса в норме, при клеточных патологиях и реверсии опухолевых клеток / Б.Н. Лю // Успехи совр. биол. – 2006. – Т.126, № 4. – С. 388–397.
14. Crane F.L. Biochemical Functions of Coenzyme Q<sub>10</sub> / F.L. Crane // J. Amer. College of Nutrition. – 2001. – Vol. 20, № 6. – P. 591–598.
15. Аронов Д.М. Применение Коэнзима Q<sub>10</sub> в кардиологической практике / Д.М. Аронов // Русс. мед. журн. – 2004. – Т. 12, № 15. – С. 905–909.
16. Ключников С.О. Убихинон (коэнзим Q<sub>10</sub>): теория и клиническая практика / С.О. Ключников, Е.С. Гнетнева // Педиатрия. – 2008. – Т. 87, № 3. – С. 103–110.