

## Ca<sup>2+</sup>-ЄМНІСТЬ МІТОХОНДРІЙ КАРЦИНОМИ ГЕРЕНА У ДИНАМІЦІ ОНКОГЕНЕЗУ ЗА УМОВ ПОПЕРЕДНЬОГО НИЗЬКОДОЗОВОГО ОПРОМІНЕННЯ

О. М. ВОЛОЩУК, М. М. МАРЧЕНКО, Н. В. САВЧУК

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

*Робота присвячена дослідженню Ca<sup>2+</sup>-ємності та інтенсивності набухання мітохондрій карциноми Герена у динаміці пухлинного росту за умов попереднього низькодозового опромінення. Дослідження проведені на білих нелінійних щурах масою 110-130 г та віком 2,5-3 місяці, поділених на групи: I – інтактні щури, II – щури з трансплантованою карциномою Герена, III – пухлиноносії, яким карциному Герена трансплантували на фоні попереднього фракціонованого рентгенівського низькодозового опромінення. Ca<sup>2+</sup>-ємність мітохондрій, отриманих методом диференційного центрифугування, визначали спектрофотометрично при 654 нм у присутності металохромного індикатора арсеназо-III. Реєстрацію набухання мітохондрій трансформованої тканини здійснювали на спектрофотометрі при довжині хвилі 520 нм. Дослідження Ca<sup>2+</sup>-ємності мітохондрій карциноми Герена показало, що на латентній стадії пухлинного росту спостерігається поглинання мітохондріями 30 % екзогенного кальцію, що свідчить про збереження здатності мітохондрій трансформованої тканини виконувати роль Ca<sup>2+</sup>-депо на початкових етапах онкогенезу. Але вже на 14 і 21 добу експерименту спостерігається різке зниження Ca<sup>2+</sup>-ємності мітохондрій ракових клітин. Водночас при дослідженні Ca<sup>2+</sup>-ємності мітохондрій пухлинних клітин за дії попереднього опромінення встановлено, що різке зниження Ca<sup>2+</sup>-ємності мітохондрій спостерігається уже з латентної стадії онкогенезу. Порушення здатності мітохондрій трансформованої тканини накопичувати Ca<sup>2+</sup> з одного боку може лежати в основі запуску механізмів, що будуть призводити до загибелі клітин, а з іншого може свідчити про деполяризацію мітохондріальної мембрани, оскільки Ca<sup>2+</sup> може надходити у мітохондрії лише через потенціалзалежний Ca<sup>2+</sup>-уніпортер. Одним із ймовірних механізмів порушення здатності мітохондрій трансформованої тканини накопичувати Ca<sup>2+</sup> може бути відкриття мітохондріальних пор неселективної проникливості, що реєструють за набуханням мітохондрій. Показано, що за даних експериментальних умов спостерігається посилення набухання мітохондрій, починаючи з 14 доби онкогенезу з тенденцією до посилення на термінальних етапах росту карциноми Герена. Водночас в мітохондріальній фракції трансформованої тканини попередньо опромінених щурів спостерігається посилення високоамплітудного набухання мітохондрій порівняно з мітохондріями пухлинної тканини неопромінених пухлиноносіїв. Зроблено висновок, що зменшення Ca<sup>2+</sup>-ємності мітохондрій трансформованої тканини супроводжується посиленням набухання мітохондрій пухлини, причому за умов попереднього низькодозового опромінення порушення здатності мітохондрій накопичувати Ca<sup>2+</sup> фіксується, починаючи уже з латентної стадії онкогенезу.*

*Ключові слова:* карцинома Герена, низькодозове опромінення, мітохондрії, Ca<sup>2+</sup>-ємність, інтенсивність набухання

**Вступ.** Мітохондрії відіграють фундаментальну роль у контролюванні внутрішньоклітинних кальцієвих транзєнтів і, відповідно, в забезпеченні кальцієвої сигналізації в цитозолі (Сарис, Карафолі, 2005). Обмін Ca<sup>2+</sup> між мітохондріями і внутрішньоклітинним середовищем відбувається за допомогою специфічних систем його транспорту: кальцій потрапляє в матрикс через Ca<sup>2+</sup>-уніпортер – потенціалзалежний Ca<sup>2+</sup>-канал внутрішньої мембрани мітохондрій, а виходить із матриксу через Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup>- і H<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup>-обмінники або через пору (Gunter et al., 2004, Акопова, 2008). Враховуючи, що мітохондрії виконують роль Ca<sup>2+</sup>-депо, послаблюючи негативні наслідки первантаження клітин катіоном, або навпаки посилюють Ca<sup>2+</sup>-сигнали, які викликаються різноманітними фізіологічними стимулами, актуаль-

ним було дослідження Ca<sup>2+</sup>-ємності та інтенсивності високоамплітудного набухання мітохондрій трансформованої тканини на різних етапах росту карциноми Герена за умов попереднього низькодозового опромінення.

**Матеріали і 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 біетики.

В якості моделі злякисного новоутворення використовували карциному Герена. Трансплантацію карциноми Герена проводили шляхом підшкірного введення 0,5 мл 30% суспензії рако-

вих клітин в ізотонічному розчині натрію хлориду. Штам пухлини наданий Інститутом експериментальної патології, онкології і радіобіології ім. Р. Є. Кавецького НАН України.

Опромінення проводили протягом семи діб щоденно в дозі  $36,12 \cdot 10^{-4}$  Кл/кг через 24 години 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 Си. На першу добу після опромінення проводили трансплантацію карциноми Герена (Марченко, Волошук, 2012).

Тварин поділили на групи: I – інтактні щурі (К), II – щурі з трансплантованою карциномою Герена (П), III – пухлиноносії, яким карциному Герена трансплантували на фоні попереднього фракціонованого рентгенівського низькодозового опромінення (Р+П).

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  $0-3^{\circ}\text{C}$ . Вміст білка визначали за Лоурі (Lowri, 1951).

$\text{Ca}^{2+}$ -ємність мітохондрій визначали спектрофотометрично при 654 нм у присутності металохромного індикатора арсеназо-III (кінцева концентрація 70 мкМ). Видалення  $\text{Ca}^{2+}$  із середовища реєстрували за зникненням характерного максимуму поглинання катіону кожні 40 с протягом 200 с (Акопова, 2008).

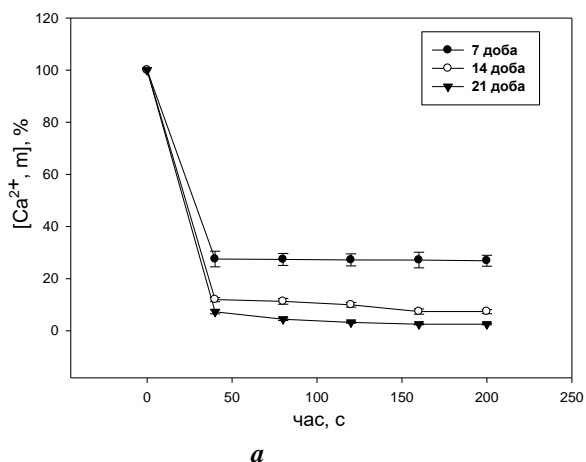


Рис. 1.  $\text{Ca}^{2+}$ -ємність мітохондрій трансформованої тканини (а)

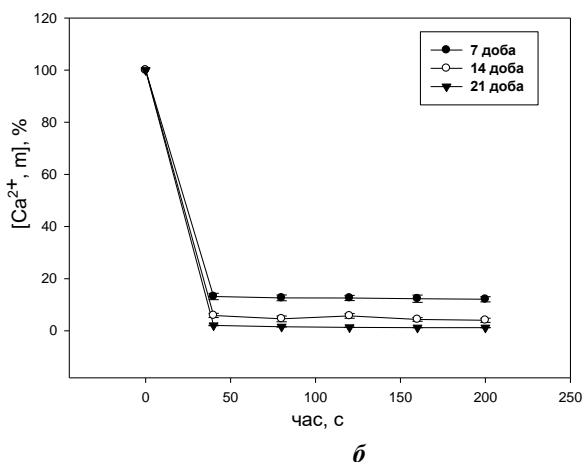
Кількість внесеного в середовище  $\text{Ca}^{2+}$  приймали за 100% (50 мкМ). Концентрацію катіону кальцію в матриксі ( $[\text{Ca}^{2+}_m]$ , %) знаходили як різницю між загальною кількістю внесеного  $\text{Ca}^{2+}$  (100%) і вмістом катіона в середовищі,  $[\text{Ca}^{2+}_0]$  (%):  

$$[\text{Ca}^{2+}_m] = 100\% - [\text{Ca}^{2+}_0]$$

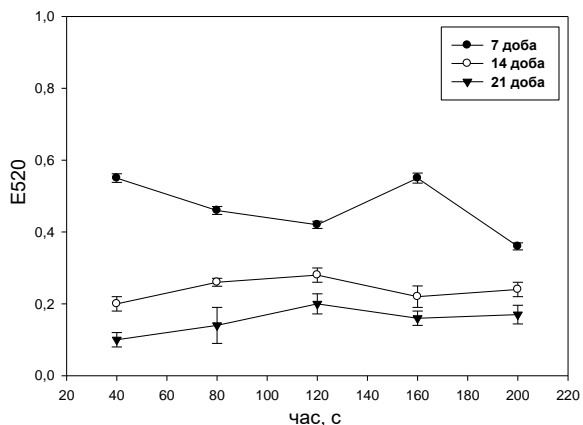
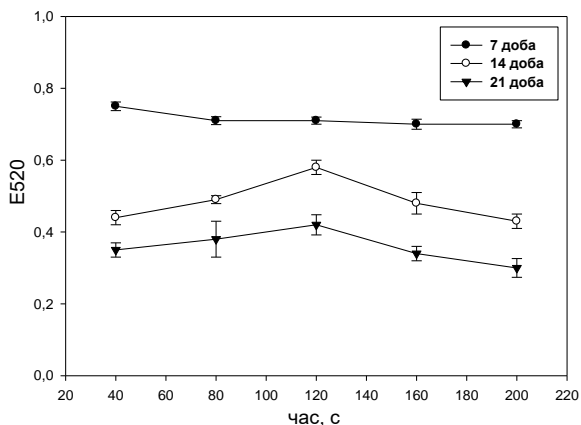
Для визначення інтенсивності набухання мітохондрій у середовище інкубації, що містило (в мМ): сахарози – 150, КСl – 50,  $\text{K}_2\text{H}_2\text{P}_4$  – 2, сукцинату – 1, тріс – 5 (рН 7,4), вносили 2 мг білка мітохондріальної фракції. Реєстрацію світлорозсіювання здійснювали на спектрофотометрі при довжині хвилі 520 нм (Акопова, 2005).

Статистичну обробку даних проводили з використанням критерію Стьюдента.

**Результати й обговорення.** Дослідження  $\text{Ca}^{2+}$ -ємності мітохондрій карциноми Герена показало, що на латентній стадії пухлинного росту спостерігається поглинання мітохондріями 30 % екзогенного кальцію (рис. 1), що свідчить про збереження здатності мітохондрій трансформованої тканини виконувати роль  $\text{Ca}^{2+}$ -депо на початкових етапах онкогенезу. Але вже на 14 і 21 добу експерименту спостерігається різке зниження  $\text{Ca}^{2+}$ -ємності мітохондрій ракових клітин. Водночас при дослідженні  $\text{Ca}^{2+}$ -ємності мітохондрій пухлинних клітин за дії попереднього опромінення встановлено, що різке зниження  $\text{Ca}^{2+}$ -ємності мітохондрій спостерігається уже з латентної стадії онкогенезу (рис. 2). Порушення здатності мітохондрій трансформованої тканини накопичувати  $\text{Ca}^{2+}$  з одного боку може лежати в основі запуску механізмів, що будуть призводити до загибелі клітин, а з іншого може свідчити про деполіаризацію мітохондріальної мембрани (Santos et al., 2007), оскільки  $\text{Ca}^{2+}$  може надходити у мітохондрії лише через потенціалзалежний  $\text{Ca}^{2+}$ -уніпортер.



$\text{Ca}^{2+}$ -ємність мітохондрій трансформованої тканини за умов попереднього низькодозового опромінення (б)



**Рис. 2.** Інтенсивність набухання мітохондрій трансформованої тканини

Одним із ймовірних механізмів порушення здатності мітохондрій трансформованої тканини накопичувати  $\text{Ca}^{2+}$  може бути відкриття мітохондріальних пор неселективної проникливості. Основними структурними компонентами пори (mitochondrial permeability transition, MPT) є порин зовнішньої мембрани (потенціалзалежний аніонний канал) та ADP/АТР-антипортер внутрішньої мембрани мітохондрій. В утворенні пори бере участь також білок матриксу циклофілін D (Baumgartner et al., 2009). Відкриття мітохондріальної пори реєструють за високоамплітудним набуханням мітохондрій (Juhászova M. et al., 2008).

Як свідчать результати проведених досліджень, за даних експериментальних умов спостерігається посилення набухання мітохондрій, починаючи з 14 доби онкогенезу з тенденцією до посилення на термінальних етапах росту карциноми Герена (рис. 3). Водночас в мітохондріальній фракції трансформованої тканини щурів, які зазнавали попереднього опромінення, спостерігається посилення високоамплітудного набухання мітохондрій порівняно з мітохондріями пухлинної тканини неопроміненних пухлиноносіїв (рис. 4).

Одним з механізмів індукції відкриття пор у мітохондріях може бути посилене вільнорадикальне окислення мітохондріальних білків, які утворюють пори, за участі АФК, генерація яких різко зростає за умов росту карциноми Герена на фоні попереднього низькодозового опромінення (Волощук, Марченко, 2011). Відкриття мітохондріальної пори, з одного боку, буде призводити до порушення здатності мітохондрій накопичувати  $\text{Ca}^{2+}$ , що буде індукувати каскад процесів, які можуть призводити до загибелі клітини (Gincel et al., 2001), а з іншого – призводити до

втрати мітохондріями їх основної функції – здатності синтезувати АТР і слугувати основним джерелом його внутрішньоклітинних запасів.

**Висновки.** Отже, зменшення  $\text{Ca}^{2+}$ -ємності мітохондрій трансформованої тканини супроводжується посиленням набухання мітохондрій пухлини, причому за умов попереднього низькодозового опромінення порушення здатності мітохондрій накопичувати  $\text{Ca}^{2+}$  фіксується, починаючи уже з латентної стадії онкогенезу.

**Список літератури:**

1. Сарис Н.-Е.Л. Роль мітохондрій в перерасподіленні внутриклеточного кальція: исторический обзор / Н.-Е. Л. Сарис, Э. Карафоли // Биохимия. – 2005. – Т. 70, № 2. – С. 231-237.
2. Gunter T.E. Calcium and mitochondria / T. E. Gunter, D. I.Yule, K. K. Gunter et al. // FEBS Lett. – 2004. – Vol. 567, № 1. – P. 96-102.
3. Акопова О.В. Роль мітохондріальної пори в трансмембранному обміні кальція в мітохондріях / О. В. Акопова // Укр. біохім. журн. – 2008. – Т. 80, № 3. – С. 40-47.
4. Марченко М.М. 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.
5. Шабалина И.Г. Активность окислительного фосфорилирования  $\text{F}^{0}\text{F}^{1}$ -АТР-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.
6. Lowri O.H. Protein measurperment With Folin phenol reagent / O.H. Lowri, N.J. Rosenbrough,

- A.L. Farr // J. Biol. Chem. – 1951. – Vol. 123, № 1. – P. 265 – 273.
7. Акопова О.В. Высвобождение  $\text{Ca}^{2+}$  из митохондрий в условиях деполяризации митохондриальной мембраны / О. В. Акопова, В. Ф. Сагач // Укр. біохім. журн. – 2005. – Т. 77, № 5. – С. 62-69.
  8. Santos N.A. Cisplatin-induced nephrotoxicity is associated with oxidative stress, redox state unbalance, impairment of energetic metabolism and apoptosis in rat kidney mitochondria / N. A. Santos, C. S. Catao, N. M. Martins et al. // Arch. Toxicol. – 2007. – Vol. 81. – P. 495-504.
  9. Baumgartner H. K. Calcium Elevation in Mitochondria is the Main  $\text{Ca}^{2+}$  Requirement for Mitochondrial Permeability Transition Pore (mPTP) Opening / H. K. Baumgartner, J. V. Gerasimenko, C. Thome // J. Biol. Chem. – 2009. – Vol. 284. – P. 20796-20803.
  10. Juhászova M. The identity and regulation of the mitochondrial permeability transition pore / M. Juhászova, S. Wang, D. V. Zorov, H. B. Nuss // Ann. N. Y. Acad. Sci. – 2008. – Vol. 1123. – P. 197-212.
  11. Волощук О.М. Динаміка співвідношення убіхінон/убіхінол в мітохондріальній фракції трансформованої тканини за умов низькодозового опромінення / О.М. Волощук, М.М. Марченко, Л. А. Біндяк // Біологічні системи. – 2011. – Т.3, вип. 3. – С. 212-215.
  12. Gincel D. Calcium binding and translocation by the voltage-dependent anion channel: a possible regulatory mechanism in mitochondrial function / D. Gincel, H. Zaid, V. Shoshan-Barmatz // J. Biochem. – 2001. – Vol. 358. – P. 147-155.

## **$\text{Ca}^{2+}$ -CAPACITY OF THE MITOCHONDRIA IN THE DYNAMICS OF GUERIN'S CARCINOMA ONCOGENESIS UNDER THE CONDITIONS OF PRELIMINARY LOW-LEVEL IRRADIATION**

**O. M. Voloshchuk, M. M. Marchenko, N. V. Savchuk**

*The research is devoted to study of the  $\text{Ca}^{2+}$ -capacity and intensity of swelling of the Guerin's carcinoma mitochondria in the dynamics of tumor growth under the conditions of preliminary low-level irradiation. Research was carried out on non-linear white rats in weight 110-130 g and at age 2,5-3 months, divided into groups: I – intact rats, II – rats with transplanted Guerin's carcinoma, III – tumor carriers with transplanted Guerin's carcinoma against the background of previous fractional low-level X-irradiation.  $\text{Ca}^{2+}$ -capacity of mitochondria, obtained by the method of differential centrifugation, was determined by spectrophotometry at 654 nm in the presence of metal-chromic indicator arsenazo-III. Registration of the mitochondria swelling of the transformed tissue was realized by spectrophotometry at 654 nm. Study of the  $\text{Ca}^{2+}$ -capacity of Guerin's carcinoma mitochondria has shown that during the latent stage of tumor growth the absorption of 30% of the exogenous calcium is observed, giving the evidence of preservation of the ability of transformed tissue mitochondria to play the role of  $\text{Ca}^{2+}$ -depot on the initial stages of ontogenesis. But already on the 14 and 21 day of the experiment the severe decrease of the  $\text{Ca}^{2+}$ -capacity of tumor cells' mitochondria is observed. At the same time the study of the  $\text{Ca}^{2+}$ -capacity of tumor cells' mitochondria under the conditions of preliminary low-level irradiation has shown that abrupt decrease of the  $\text{Ca}^{2+}$ -capacity is observed already on the latent stage of oncogenesis. The disturbance of the ability of transformed tissue mitochondria to accumulate  $\text{Ca}^{2+}$  may underlie, on the one hand, the starting of mechanisms leading to the death of cells, and, on the other hand, can evidence the depolarization of the mitochondrial membrane, because  $\text{Ca}^{2+}$  enters the cell only through the potential-dependent  $\text{Ca}^{2+}$ -uniporter. One of the possible mechanisms of the disturbances of transformed tissue mitochondria ability to accumulate  $\text{Ca}^{2+}$  can be the opening of mitochondrial pores of non-selective permeability, registered by the swelling of mitochondria. It is shown, that under the current experimental conditions increased swelling of mitochondria is observed beginning from the 14 day of oncogenesis with the tendency to intensification on the terminal stages of Guerin's carcinoma growth. At the same time in the mitochondrial fraction of the transformed tissue of preliminary irradiated rats the intensification of the of the high-amplitude mitochondria swelling comparing to the tumor tissue mitochondria of unirradiated tumor carriers is observed. The conclusion was made that decrease of the transformed tissue mitochondria  $\text{Ca}^{2+}$ -capacity is accompanied with the intensification of tumor mitochondria swelling, at that under the conditions of preliminary low-level irradiation the disturbance of the mitochondria ability to accumulate  $\text{Ca}^{2+}$  is fixed beginning from the latent stage of oncogenesis.*

*Key words: Guerin's carcinoma, low-level irradiation, mitochondria,  $\text{Ca}^{2+}$ -capacity, intensity of swelling.*

*Одержано редколлегією 12.11.2013*