



Стан ензиматичної та неензиматичної ланок антиоксидантного захисту печінки щурів-пухлиноносіїв за дії лазерного опромінення

О. В. Кеца, А. В. Онежко, М. М. Марченко

o.ketsa@chnu.edu.ua

Чернівецький національний університет ім. Юрія Федьковича,
вул. Коцюбинського, 2, м. Чернівці, 58012, Україна

У роботі проведено дослідження активності ензимів антиоксидантного захисту — супероксиддисмутази (СОД), каталази та глутатіонтрансферази, а також визначено рівень низькомолекулярних антиоксидантів — вітаміну Е та аскорбінової кислоти в субклітинних фракціях печінки щурів з трансплантованою карциномою Герена. Показано, що в печінці щурів-пухлиноносіїв у логарифмічну фазу онкогенезу підвищується активність компонентів ензиматичної ланки антиоксидантної системи (АОС) та вміст вітаміну Е з одночасним зниженням рівня аскорбінової кислоти. У стаціонарну фазу онкогенезу у клітинах печінки щурів-пухлиноносіїв спостерігається виснаження АОС, про що свідчать зниження активності антиоксидантних ензимів та зниження рівня низькомолекулярних антиоксидантів. Встановлено, що вплив лазерного опромінення щурів у ділянку росту пухлини проявляється підвищенням активностей СОД, каталази та вмісту вітаміну Е у стаціонарну фазу росту карциноми Герена в організмі порівняно з показниками неопромінених пухлиноносіїв.

Ключові слова: супероксиддисмутаза, глутатіонтрансфераза, каталаза, вітамін Е, аскорбінова кислота, карцинома Герена, лазерне опромінення, печінка

Вивчення біохімічних механізмів онкологічної патології та виявлення можливих підходів її лікування — один із провідних напрямів комплексних досліджень у біології та медицині. Ріст новоутворення в організмі супроводжується порушенням прооксидантно-антиоксидантного статусу за участю активних форм оксигену (АФО) [1, 10], що може призвести до змін у функціонуванні АОС, зокрема її ензиматичної та неензиматичної ланок, у віддалених органах. Зміна балансу між антиоксидантами та окиснювачами має як позитивний, так і негативний вплив, оскільки цей дисбаланс створюється внаслідок протидії організму різним чинникам — канцерогенезу, запальним процесам, дії лазерного, ультрафіолетового та інших видів опромінення [3, 4].

Механізми протипухлинної дії лазерного опромінення вивчені недостатньо, оскільки його ефект може проявлятися не лише за безпосереднього впливу на трансформовану тканину, але й опосередкованою дією на інші органи, зокрема печінку [12].

АОС печінки одна з перших реагує на онкогенез і опромінення, що пов'язане з важливістю та особливостями функціонування цього органу в організмі. Основними компонентами ензиматичної ланки АОС є супероксиддисмутаза (КФ 1.15.1.1, СОД) і каталаза (КФ 1.11.1.6). СОД каталізує дисмутацію супероксидного аніон-радикала (O_2^-) у пероксид гідрогену (H_2O_2),

тому цей ензим вважають одним із найпотужніших внутрішньоклітинних антиоксидантів [15]. Утворений H_2O_2 розщеплюється ензимом каталазою, яка каталізує його перетворення у воду та кисень [8]. Утворені в клітині гідропероксиди органічних молекул утилізуються за участю іншого антиоксидантного ензиму — глутатіонтрансферази (КФ 2.5.1.18, ГТ) [11].

Сьогодні залишається незрозумілим, яка ланка антиоксидантного захисту — ензиматична чи неензиматична (вітамін Е, аскорбінова кислота) — насамперед бере участь в захисті клітин печінки за умов онкогенезу та лазерного опромінення.

Мета роботи — дослідити активність ензимів антиоксидантного захисту та вміст низькомолекулярних антиоксидантів у субклітинних фракціях печінки щурів-пухлиноносіїв за умов впливу лазерного опромінення.

Матеріали і методи

Дослідження провели на білих статевозрілих щурах масою 120–150 г, яких утримували на стандартному раціоні віварію. Утримання і всі маніпуляції з тваринами проводили згідно з положеннями «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються для дослідних та наукових цілей»

(Страсбург, 1986) та «Загальних етичних принципів експериментів на тваринах», ухвалених Першим національним конгресом з біоетики (Київ, 2001) (Протокол №2 від 29.09.2020 р. Комітету з біоетики Інституту біології, хімії та біоресурсів Чернівецького національного університету ім. Юрія Федьковича).

Усіх експериментальних тварин поділили на групи по 9 щурів у кожній: К — контрольна група (інтактні тварини); ЛО — тварини, яких опромінювали лазерним діодом у ділянку стегна правої кінцівки; Пх — щури з трансплантованою карциномою Герена; Пх+ЛО — щури-пухлиноносії, які отримували лазерне опромінення у ділянку росту карциноми Герена.

Як модель злоякісного новоутворення використовували карциному Герена, трансплантацію якої здійснювали підшкірним введенням в ділянку стегна правої кінцівки. Після семиденного росту пухлини вона зазнавала локальної спрямованої дії лазерного опромінення. Щоденна тривалість опромінення становила 4 хв. Опромінення щурів здійснювали лазерним діодом у червоному діапазоні спектра потужністю 50 мВт, довжиною хвилі 650 нм.

Евтаназію тварин проводили із застосування ефірного наркозу на 14- та 21-у доби росту карциноми Герена, що відповідає періоду інтенсивного та кінцевого росту цієї пухлини відповідно.

Ензиматичну активність СОД і каталази визначали в мітохондріальній фракції, яку виділяли методом диференційного центрифугування [19]. Супероксиддисмутазну активність визначали за здатністю СОД інгібувати автоокиснення адреналіну [16]. Визначення каталазної активності проводили з використанням H_2O_2 , який з солями молібдену утворює стійкий зафарбований комплекс, що дає максимум поглинання за 410 нм [9]. Глутатіонтрансферазну активність у мікросомній фракції визначали за початковою швидкістю утворення кон'югату відновленого глутатіону з 1-хлор-2,4-динітробензолом та виражали в ммоль/хв на мг протеїну [18]. Мікросомну фракцію виділяли диференційним центрифугуванням [14]. Рівень вітаміну Е визначали методом [17], а вміст аскорбінової кислоти в мітохондріальній фракції визначали за реакцією Тільманса методом С. Farmer & A. Abt [2]. Отримані результати обробляли методом варіаційної статистики з використанням t -критерію Стьюдента.

Результати й обговорення

Процес розвитку в організмі злоякісного новоутворення супроводжується зміною окисно-відновної рівноваги за участю АФО, що призводить до зміни АОС і передусім її ензиматичної ланки. Генерація супероксидного радикала за умов онкогенезу може мати негативні наслідки, оскільки він перетворюється в більш реакційно здатний гідроксильний радикал. Оскільки утворення O_2^- відбувається здебільшого в мітохондріальному ланцюзі перенесення електронів у результаті їх вивільнення від проміжних компонентів ланцюга на кисень [6], то мітохондріальна СОД слугує першою ланкою захисту клітин від небезпечної дії O_2^- .

Аналіз ензиматичної активності СОД за умови росту в організмі карциноми Герена показав, що в логарифмічну фазу онкогенезу відбувається підвищення

рифмічну фазу онкогенезу відбувається підвищення у 2,2 раза ензиматичної активності СОД в мітохондріальній фракції печінки щурів-пухлиноносіїв порівняно з контрольною групою (рис. 1). Підвищення супероксиддисмутазної активності, імовірно, відбувається у відповідь на інтенсивну генерацію O_2^- в електрон-транспортному ланцюзі мітохондрій [15].

У стаціонарну фазу онкогенезу виявлено зниження активності СОД (рис. 1), що, очевидно, пов'язано з окиснювальною модифікацією цього ензиму на пізніх стадіях онкогенезу. Виявлені зміни сприяють зниженню захисту клітин печінки від токсичної дії супероксидного радикала.

Зниження активності СОД може призводити до підвищення рівня O_2^- , який є попередником H_2O_2 . Пероксид гідрогену може легко перетворюватися в найбільш реакційно здатний гідроксильний радикал [6]. Проте за фізіологічних умов H_2O_2 знешкоджується каталазою [5]. Для розуміння напрямку вільнорадикальних процесів наступним етапом було визначення ензиматичної активності каталази у мітохондріальній фракції печінки щурів-пухлиноносіїв.

У щурів з трансплантованою карциномою Герена каталазна активність спочатку підвищується в 1,8 раза порівняно з контролем в логарифмічну фазу, а потім з ростом новоутворення у стаціонарну фазу — знижується (рис. 2).

Опромінення щурів лазерним діодом у ділянку росту карциноми Герена не показало змін ензиматичної активності СОД та каталази в мітохондріальній фракції печінки в логарифмічну фазу онкогенезу з подальшим підвищенням активності цих ензимів у стаціонарну фазу (рис. 1). Імовірно, спрямована дія лазерного опромінення на пухлину сприяє зниженню темпів її росту, у зв'язку з чим ми спостерігаємо зниження її впливу на АОС у печінці. За умови лазерного опромінення у стаціонарну фазу онкогенезу спостерігається підвищення активності СОД та каталази в мітохондріальній фракції печінки (рис. 1, 2).

Іншим ензимом антиоксидантного захисту в клітинах є мікросомна глутатіонтрансфераза. Аналіз результатів показав підвищення активності цього ензиму в логарифмічну фазу онкогенезу з подальшим зниженням його активності у стаціонарну фазу (рис. 3), що може свідчити про деструктивні процеси в мембранах ендоплазматичного ретикулуму (ЕР) печінки за умов росту в організмі карциноми Герена.

Лазерне опромінення тварин не призводить до змін глутатіонтрансферазної активності в логарифмічну фазу онкогенезу і сприяє зниженню активності цього ензиму в стаціонарну фазу онкогенезу (рис. 3). Однак досліджуваний показник не досягає значень неопромінених пухлиноносіїв, що свідчить про менш деструктивні зміни в мембранах ЕР за умов онкогенезу та дії лазерного опромінення.

Показники ензимів АОС в опромінених щурів-пухлиноносіїв в логарифмічну фазу онкогенезу (14-а доба), які залишаються на рівні показників інтактних тварин, можуть вказувати на зниження темпів росту карциноми Герена у результаті антиканцерогенної дії лазерного опромінення, при цьому вплив росту пухлини на печінку знижується. Підвищення активності СОД і каталази у стаціонарну фазу онкогенезу вказує на пролонговану дію росту пухлини на печінку.

Зміни активностей компонентів ензиматичної ланки антиоксидантного захисту можуть бути пов'язані із компонентами її ланки, одними з яких є вітамін Е та аскорбінова кислота.

Вітамін Е — основний ендogenous жиророзчинний антиоксидант, який в мембранах мітохондрій свою антиоксидантну функцію проявляє трьома шляхами: 1) створює компактну мембранну архітектуру, що запобігає атаці АФО на ненасичені жирні кислоти фосфоліпідів мембран; 2) локально руйнує утворені пероксиди; 3) знешкоджує окиснені радикали в полярних ділянках мітохондріальних мембран, де локалізовані білки електрон-транспортного ланцюга [8, 20].

Аналіз результатів вмісту вітаміну Е в мітохондріальній фракції печінки щурів-пухлиноносіїв показав, що на 14-у добу цей показник у 2 рази перевищує показники тварин контрольної групи, тоді як на 21-добу спостерігається його зниження (рис. 4).

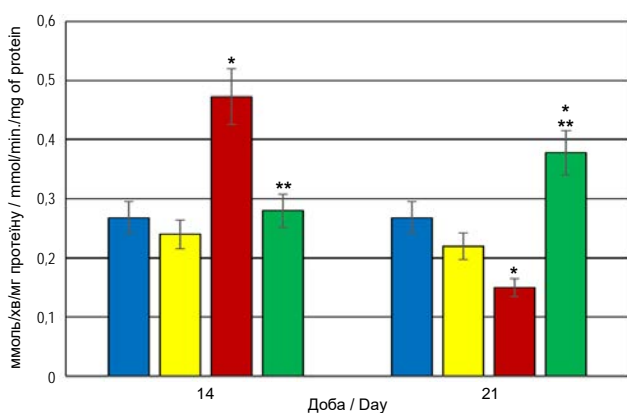


Рис. 2. Каталазна активність у мітохондріальній фракції печінки щурів за дії лазерного опромінення

Fig. 2. Catalase activity in the liver mitochondrial fraction of tumor-bearing rats under the action of laser irradiation

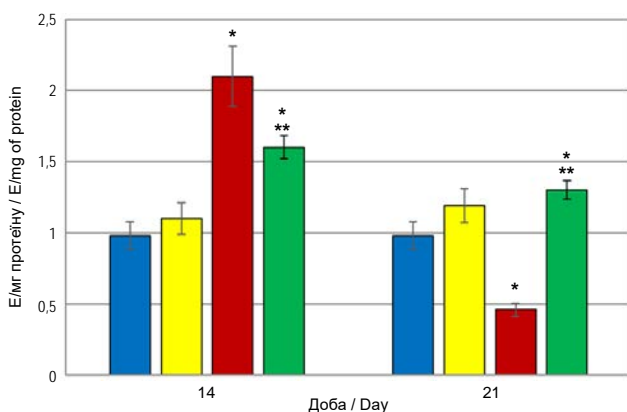


Рис. 4. Вміст вітаміну Е в мітохондріальній фракції печінки щурів-пухлиноносіїв за дії лазерного опромінення

Fig. 4. The level of vitamin E in the liver mitochondrial fraction of tumor-bearing rats under the action of laser irradiation

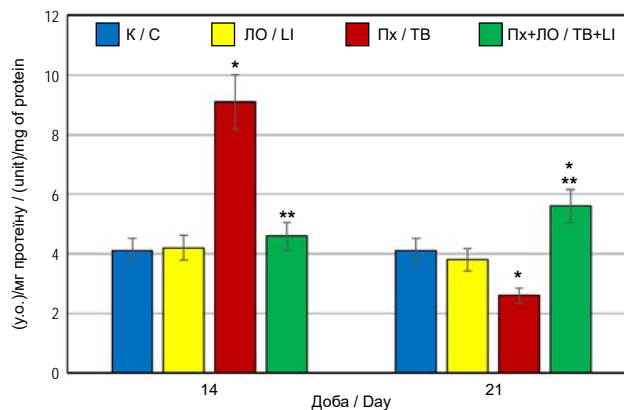


Рис. 1. Супероксиддисмутазна активність у мітохондріальній фракції печінки щурів-пухлиноносіїв за дії лазерного опромінення

Fig. 1. Superoxide dismutase activity in the liver mitochondrial fraction of tumor-bearing rats under the action of laser irradiation

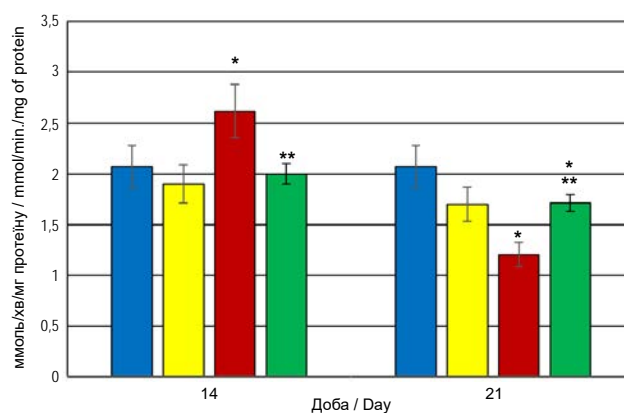


Рис. 3. Глутатіонтрансферазна активність у мікросомній фракції печінки щурів-пухлиноносіїв за дії лазерного опромінення

Fig. 3. Glutathione transferase activity in the liver mitochondrial fraction of tumor-bearing rats under the action of laser irradiation

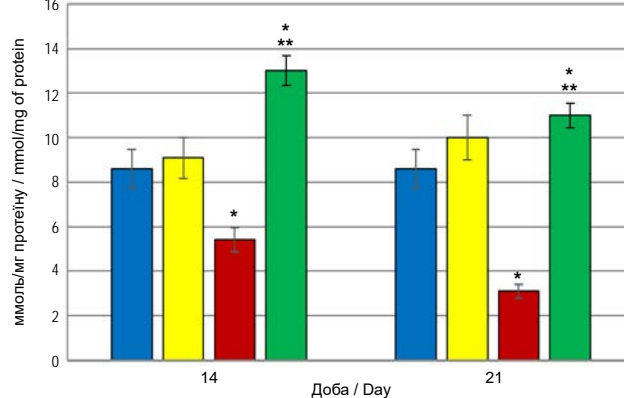


Рис. 5. Вміст аскорбінової кислоти в мітохондріальній фракції печінки щурів-пухлиноносіїв за дії лазерного опромінення

Fig. 5. The level of ascorbic acid in the liver mitochondrial fraction of tumor-bearing rats under the action of laser irradiation

Примітка. К — інтактні тварини (контроль); ЛО — щури, які зазнавали дії лазерного опромінення; Пх — щури з трансплантованою карциномою Герена; Пх+ЛО — щури з трансплантованою карциномою Герена, які зазнавали дії лазерного опромінення.

* — статистично вірогідна різниця порівняно з групою інтактних тварин; ** — статистично вірогідна різниця порівняно з неопроміненими щурами-пухлиноносійми ($P \leq 0,05$).

Note. C — intact animals (control); LI — rats which were irradiated daily with a laser diode; TB — rats with transplanted Guerin's carcinoma; TB+LI — rats with transplanted Guerin's carcinoma, which were exposed to laser irradiation.

* — statistically significant difference compared with control ($P \leq 0,05$); ** — statistically significant difference compared with non-irradiated tumor-bearing rats ($P \leq 0,05$).

Водночас під час опромінення лазерним діодом рівень вітаміну Е в мітохондріальній фракції щурів-пухлиноносіїв перевищує показники контролю як на 14-у, так і на 21-у доби онкогенезу (рис. 4). Варто зауважити, що рівень вітаміну Е у цієї групи тварин підвищений навіть тоді, коли активність ензимів АОС не відрізняється від показників контролю (14-а доба онкогенезу) (рис. 1, 2, 3), що вказує на компенсаторну реакцію АОС за рахунок неензиматичних низькомолекулярних антиоксидантів.

Зниження рівня вітаміну Е може відбуватися за рахунок зниження рівня аскорбінової кислоти у печінці, оскільки один із механізмів її дії — взаємодія з α -токоферолом, відновленням глутатионом, зв'язування супероксидного та гідроксильного радикалів, пероксиду гідрогену, сиглентного оксигену [7, 13].

Аналіз результатів показав, що як у логарифмічну, так і в стаціонарну фази онкогенезу рівень аскорбінової кислоти в мітохондріальній фракції печінки щурів-пухлиноносіїв знижується порівняно з показниками інтактних тварин (рис. 5).

Зниженням вмісту аскорбінової кислоти в мітохондріях клітин печінки може відбуватися внаслідок її затримування на відновлення фенольної форми α -токоферолу, чи внаслідок зв'язування з супероксидним радикалом та пероксидом гідрогену.

Висновки

Дослідження компонентів ензиматичної та неензиматичної ланок антиоксидантного захисту показали, що в печінці щурів з трансплантованою карциномою Герена в стаціонарну фазу онкогенезу знижується ензиматична активність СОД, каталази, ГТ та рівень аскорбінової кислоти поряд з підвищенням рівня вітаміну Е. Чотирнадцятиденне опромінення лазерним діодом в ділянку росту пухлини знижує її вплив на антиоксидантну систему печінки, про що свідчить мобілізація як ензиматичної, так і неензиматичної ланок антиоксидантного захисту в субклітинних фракціях печінки щурів, яка проявляється підвищенням активностей супероксиддисмутази, каталази та вмісту вітаміну Е в стаціонарну фазу росту карциноми Герена в організмі.

Перспективи подальших досліджень

Дослідження антиоксидантної системи в клітинах печінки організму-пухлиноносія за умов спрямованої дії лазерного опромінення в ділянку росту новоутворення дадуть можливість зрозуміти механізми протипухлинної дії та його опосередкований вплив на віддалені органи, що дозволить широко застосовувати цей вид опромінення у медицині.

1. Chikara S, Nagaprasanth LD, Singhal J, Horne D, Awasthi S, Singhal SS. Oxidative stress and dietary phytochemicals: role in cancer chemoprevention and treatment. *Cancer Lett.* 2018; 413: 122–134. DOI: 10.1016/j.canlet.2017.11.002.
2. Farmer C, Abt AF. Determination of reduced ascorbic acid in small amounts of blood. *Proc. Soc. Biol. Med.* 1936; 34 (2): 146–150. DOI: 10.3181%2F00379727-34-8535C.

3. Fujimoto T, Ito S, Ito M, Kanazawa H, Yamaguchi S. Induction of different reactive oxygen species in the skin during various laser therapies and their inhibition by fullerene. *Lasers Surg. Med.* 2012; 44 (8): 685–694. DOI: 10.1002/lsm.22065.
4. Gill JG, Piskounova E, Morrison SJ. Cancer, oxidative stress, and metastasis. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 2016; 81: 163–175. DOI: 10.1101/sqb.2016.81.030791.
5. Glorieux C, Calderon PB. Catalase, a remarkable enzyme: targeting the oldest antioxidant enzyme to find a new cancer treatment approach. *Biol. Chem.* 2017; 398 (10): 1095–1108. DOI: 10.1515/hsz-2017-0131.
6. Hrycaj EG, Bandiera SM. Involvement of Cytochrome P450 in Reactive Oxygen Species Formation and Cancer. *Adv. Pharmacol.* 2015; 74: 35–84. DOI: 10.1016/bs.apha.2015.03.003.
7. Ibuki FK, Bergamaschi CT, da Silva Pedrosa M, Nogueira FN. Effect of vitamin C and E on oxidative stress and antioxidant system in the salivary glands of STZ-induced diabetic rats. *Arch. Oral. Biol.* 2020; 116: 104765. DOI: 10.1016/j.archoralbio.2020.104765.
8. Jiang Q. Natural forms of vitamin E as effective agents for cancer prevention and therapy. *Adv. Nutr.* 2017; 8 (6): 850–867. DOI: 10.3945/an.117.016329.
9. Korolyuk MA, Ivanova LI, Mayorova IG, Tokareva VE. Method for determination of catalase activity. *Lab Work.* 1988; 1: 16–19. (in Russian)
10. Moloney JN, Cotter TG. ROS signalling in the biology of cancer. *Semin. Cell Dev. Biol.* 2018; 80: 50–64. DOI: 10.1016/j.semcdb.2017.05.023.
11. Morris G, Anderson G, Dean O, Berk M, Galecki P, Martin-Subero M, Maes M. The glutathione system: a new drug target in neuro-immune disorders. *Mol. Neurobiol.* 2014; 50 (3): 1059–1084. DOI: 10.1007/s12035-014-8705-x.
12. Mumic FT, Silveira MRG, Vilalva KH, Jordani ME, Gomes MCJ, Vanni JC, Vollet Filho JD, Kurachi C, Bagnato VS, Silva OC. Effect of irradiation with different laser wavelengths on oxidative stress of non-hepatectomized rats. *Acta Cir. Bras.* 2016; 31 (1): 40–44. DOI: 10.1590/S0102-86502016001300009.
13. Pawlowska E, Szczepanska J, Blasiak J. Pro- and antioxidant effects of vitamin C in cancer in correspondence to its dietary and pharmacological concentrations. *Oxid. Med. Cell Longev.* 2019; 2019: 7286737. DOI: 10.1155/2019/7286737.
14. Schenkman JB, Cinti DL. Preparation of microsomes with Calcium. *Method. Enzymol.* 1978; 52 (C): 83–89. DOI: 10.1016/S0076-6879(78)52008-9.
15. Sheng Y, Abreu IA, Cabelli DE, Maroney MJ, Miller AF, Teixeira M, Valentine JS. Superoxide dismutases and superoxide reductases. *Chem. Rev.* 2014; 114 (7): 3854–3918. DOI: 10.1021/cr4005296.
16. Sirota TV. Novel approach to the study of adrenaline auto-oxidation and its use for the measurements of superoxide dismutase activity. *Vopr. Med. Khim.* 1999; 45 (3): 109–116. PMID: 10432564. (in Russian)
17. Trineeva OV. Methods of analysis of vitamin E. *Vestn. VSU. Chem., Biol., Pharm. Series.* 2013; 1: 212–224. Available at: <http://www.vestnik.vsu.ru/pdf/chembio/2013/01/2013-01-36.pdf> (in Russian)
18. Vlasova SN, Shabunina EI, Pereslegina IA. The activity of the glutathione-dependent enzymes of erythrocytes in chronic liver diseases in children. *Lab. Delo.* 1990; 8: 19–22. PMID: 1705592. (in Russian)
19. Weinbach EC. A procedure for isolating stable mitochondria from rat liver and kidney. *Anal. Biochem.* 1961; 2 (4): 335–343. DOI: 10.1016/0003-2697(61)90006-9.
20. Yang CS, Luo P, Zeng Z, Wang H, Malafa M, Suh N. Vitamin E and cancer prevention: studies with different forms of tocopherols and tocotrienols. *Mol. Carcinogen.* 2020; 59 (4): 365–389. DOI: 10.1002/mc.23160.

State of enzymatic and non-enzymatic links of antioxidant protection of the liver of tumor-bearing rats under the action of laser irradiation

O. V. Ketsa, A. V. Onezhko, M. M. Marchenko
o.ketsa@chnu.edu.ua

Fedkovich Chernovtsy National University
2, Kotsiubynskoho str., 58012, Chernivtsi

The activity of antioxidant enzymes — superoxidedismutase (SOD), catalase and glutathionetransferase, and also the level of low molecular weight antioxidants — vitamin E and ascorbic acid in the liver subcellular fractions of rat with transplanted of Guerin's carcinoma it was investigated. It is shown that in the liver of tumor-bearing rats in the logarithmic phase of oncogenesis increases the activity of the components of the enzymatic link of the antioxidant system (AOS) and the content of vitamin E with a simultaneous decrease of ascorbic acid. The AOS depletion is expressed by a decrease of antioxidant enzymes activity and a decrease the level of low molecular weight antioxidants in the stationary phase of oncogenesis in the liver cells of tumor-bearing rats. It was found that laser irradiation of rats in the area of tumor growth reduces its effect on liver AOS, which is manifested by increased activity of SOD, catalase and vitamin E content in the stationary phase of Guerin's carcinoma growth in the body.

Key words: superoxidedismutase, glutathionetransferase, catalase, vitamin E, ascorbic acid, Guerin's carcinoma, laser irradiation, liver

Ketsa OV, Onezhko AV, Marchenko MM. State of enzymatic and non-enzymatic links of antioxidant protection of the liver of tumor-bearing rats under the action of laser irradiation. *Biol. Tvarin.* 2020; 22 (4): 13–17. DOI: 10.15407/animbiol22.04.013.