

РОЛЬ ЭКЗОГЕННЫХ ОКСИДОВ АЗОТА В МОДУЛЯЦИИ БИОЭНЕРГЕТИЧЕСКОГО СТАТУСА И УРОВНЯ ФОСФОЛИПИДОВ В НОРМАЛЬНЫХ И ОПУХОЛЕВЫХ ТКАНЯХ

В.М. Михайленко, Л.О. Елейко

*Институт экспериментальной патологии, онкологии и
радиобиологии им. Р.Е. Кавецкого (Киев)*

Вступление

Оксиды азота (NOx) являются одними из наиболее распространенных загрязнителей воздуха, особенно в больших городах и промышленных зонах. Действие экзогенных NOx на организм связано с возникновением нитрозативного стресса, вследствие чего происходит нитрозирование биологических тиолов, пептидов, белков. Это изменяет функциональную активность макромолекул, а также может привести к образованию канцерогенных нитрозосоединений *in vivo*. До настоящего времени остается до конца не выясненной роль экзогенных NOx в формировании нитрозативного стресса в организме, а также влияние эндогенного и экзогенного оксидов азота на рост опухолей. Моноксид азота выступает в роли важного фактора защиты организма от раковых заболеваний [2], однако есть данные о том, что он может стимулировать рост опухолей [4,7,8,9].

Целью работы было установить влияние экзогенных NOx на энергетический метаболизм и уровень фосфолипидов в опухоли карциномы Герена (КГ) и печени крыс.

Материалы и методы исследования

Для проведения исследований использовали белых нелинейных самцов крыс массой 140-180 г из вивария Института экспериментальной патологии, онкологии и радиобиологии им. Р.Е. Кавецкого, НАН Украины. Все процедуры с животными проводили согласно международных норм. Животных разделили на 5 экспериментальных групп: 1) интактный контроль (ИК); 2) животные, которые подвергались ингаляционному действию NOx

на протяжении 1 месяца (16 ч/сутки, средняя концентрация NOx в камере - 150 мг/м³) (ОА); 3) животные, которым перивали суспензию клеток КГ (КГ); 5) животные, которым перивали КГ после указанного действия NOx (ОА+КГ). Перевивку опухоли проводили путем подкожного введения в область бедра 0,5 мл суспензии, содержащей 2,2 x 10⁶ клеток. Исследования энергетического статуса и содержания фосфолипидов проводили на 12 и 18 сутки опухолевого роста.

³¹P-ЯМР спектроскопия позволяет одновременно провести оценку уровня основных фосфорсодержащих метаболитов клетки. Энергетический статус в клетках опухоли КГ и печени крыс характеризовали методом ³¹P ЯМР по соотношениям нуклеозидтрифосфаты/неорганический фосфор (βНТФ/Фн), фосфокреатин/Фн (ФКр/Фн), фосфомоноэфиры/βНТФ (ФМЭ/βНТФ). Уровень обмена компонентов мембран оценивали по соотношению фосфомоноэфиры/фосфодиэфиры (ФМЭ/ФДЭ). Методом ³¹P ЯМР-спектроскопии также определяли уровень фосфолипидов, таких как фосфатидилхолин (ФтХ), сфингомиелин (СМ), фосфатидилсерин (ФтС), фосфатидилинозитол (ФтИ) и кардиолипин. Степень структуризации мембран оценивали по соотношению ФтХ/СМ.

Полученные результаты и их обсуждение

Одним из главных показателей функционального состояния клетки является уровень энергетического метаболизма. Высокий уровень энергетического метаболизма характеризуется высоким содержанием НТФ и относительно низким содержанием Фн, и соответственно повышенным соотношением βНТФ/Фн. При патологическом процессе или гипоксии уровень НТФ уменьшается, содержание Фн увеличивается, что приводит к снижению соотношения βНТФ/Фн.

Ингаляционное действие NOx повышало соотношение βНТФ/Фн в опухоли в 3 и 2,5 раза на ранних и поздних сроках роста КГ, соответственно (табл.1). Параллельно наблюдалось достоверное уменьшение (в 1,9 раза) соотношения βНТФ/Фн в ткани печени крыс по сравнению с группой ИК, что свидетельствует о снижении уровня энергетического метаболизма в организме животных. Это также подтверждается

и уменьшением соотношения ФКр/Фн в печени животных относительно группы ИК. В опухоли животных группы ОА+КГ соотношение ФКр/Фн превышало его значение в группе КГ на ранних сроках роста КГ. Соотношение ФМЭ/βНТФ, в печени животных группы ОА в 2,3 раза превышало его значение в контрольной группе, что указывает на усиление степени гипоксии клеток. Действие NOx сопровождалось уменьшением в 2,5 и 2 раза соотношения ФМЭ/βНТФ в опухоли на 12 и 18 сутки роста КГ (табл.1).

Таблица 1

Соотношения фосфорсодержащих метаболитов, характеризующих энергетический статус клеток

Орган	Группа	Фосфорсодержащие метаболиты			
		βНТФ/Ф _n	ФКр/Ф _n	ФМЭ/βНТФ	ФМЭ/ФДЭ
Печень	ОА	53,85*	35,80*	229,46*	85,06*
	КГ12	30,24*	90,28	735,42*	63,38*
	ОА+КГ12	35,59*	135,18	424,92*	87,01
	КГ18	42,21*	69,68	331,40*	125,94
	ОА+КГ18	31,43*	233,89	303,53*	112,47
Опухоль	ОА+КГ12	299,52*	-	50,77*	100,16
	ОА+КГ18	253,12*	67,75	53,89*	145,25*

Примечания: значения приведены в % по отношению к соответствующим контрольным группам; * - p<0,05.

Еще одной важной характеристикой метаболизма клетки является уровень обмена компонентов мембран. Его оценивали по содержанию таких соединений, как глицерофосфоэтаноламин (ГФЭ), глицерофосфохолин (ГФХ), фосфохолин (ФХ), фосфоэтаноламин (ФЭ). ФХ и ФЭ принадлежат к ФМЭ и являются субстратами для синтеза фосфолипидов мембран ФТХ и ФТЭ, ГФЭ и ГФХ - продукты распада мембран. Поэтому, усиление синтеза мембран будет отмечаться ростом соотношения ФМЭ/ФДЭ, а интенсификация распада мембран или ингибирование их синтеза - соответственно низким соотношением ФМЭ/ФДЭ. Действие NOx сопровождалось уменьшением этого соотношения в 1,2 раза в печени крыс по сравнению с ИК.

В печени было также зафиксировано уменьшение соотношения ФМЭ/ФДЭ на ранних сроках роста КГ и его увеличение на поздних сроках. Действие экзогенных NOx не приводит

Проблеми екологічної та медичної генетики і клінічної імунології

ло к изменению соотношения ФМЭ/ФДЭ в опухоли на ранней стадии ее развития, однако на поздних сроках роста КГ было зафиксировано достоверное его увеличение в 1,5 раза (табл.1). Полученные результаты согласовываются с нашими данными об ускорении роста опухоли на поздних сроках после длительного ингаляционного воздействия NOx [6].

Физико-химические свойства клеточных мембран оценивали по соотношению ФТХ/СМ, изменение которого влияет на степень структуризации мембран [1]. Уменьшение величины этого соотношения указывает на повышение структуризации мембран и уменьшение их проницаемости, увеличение - на уменьшение вязкости мембран и увеличение проницаемости.

Действие NOx сопровождалось уменьшением соотношения ФТХ/СМ в печени (1,3 раза) по сравнению с контролем. Однако в печени крыс группы ОА+КГ наблюдалась тенденция к увеличению этого соотношения на ранних и поздних сроках роста опухоли по сравнению с группой КГ. В клетках КГ соотношение ФХ/СМ уменьшалось при действии NOx на ранних этапах роста опухоли (табл.2).

Таблица 2

Содержание фосфолипидов характеризующих структурно-функциональное состояние мембран клеток печени и опухоли

Орган	Группа	Содержание фосфолипидов			
		ФтС	ФтИ	кардиолипид	ФтХ/СМ
Печень	ОА	142,12	77,29	88,14	76,28*
	КГ12	121,60	66,96	82,29	78,01
	ОА+КГ12	91,96**	92,16	74,41*	96,11
	КГ18	149,61	97,71	78,03*	78,71
	ОА+КГ18	102,71**	99,87	78,69*	95,18
Опухоль	ОА+КГ12	71,05*	64,9	110,69	117
	ОА+КГ18	73,42	101,25	140,39	101,3

Примечания: значения приведены в % по отношению к соответствующим контрольным группам; * - p<0,05; ** - p<0,05 по отношению к соответствующему контролю.

Содержание кардиолипина в печени уменьшалось (в среднем в 1,3 раза) как при действии NOx, так и при росте КГ. В опухоли наблюдалась тенденция к уменьшению содержания

Екологічні аспекти сучасної біології та медичної генетики

кардиолипина на поздних сроках роста КГ. Однако, уровень кардиолипина в опухоли в группе ОА+КГ превышал таковой в группе КГ (табл.2). Повышение содержания кардиолипина в опухоли при действии NOx может быть обусловлено увеличением количества митохондрий как компенсация последствий нехватки кислорода. Увеличение содержания кардиолипина повышает осмотическую стабильность митохондрий [5] и способствует торможению апоптоза [3], что положительно влияет на рост опухоли. На поздних этапах рост опухоли замедлялся, часть клеток погибала путем некроза/апоптоза, что коррелировало со снижением содержания кардиолипина.

Уровень ФтС в печени крыс повышался как при действии NOx, так и на поздних этапах роста опухоли. Однако, в печени крыс с КГ, подвергшихся действию NOx, содержание ФтС снижалось в 1,3 раза на ранних и в 1,5 раза на поздних сроках роста опухоли. В опухоли содержание ФтС увеличивалось по мере роста КГ. Однако уровень ФтС был сниженным в опухоли крыс группы ОА+КГ по сравнению с КГ в 1,4 раза на ранних сроках роста. Последнее может происходить вследствие ингибирования синтеза этого фосфолипида вызванного действием NOx. Поскольку ФтС выступает в роли кофактора протеинкиназы С, активность которой увеличивается при пролиферации, а также в качестве одного из маркеров апоптоза [10], то снижение его уровня в опухоли при действии NOx будет оказывать значительное влияние на эти процессы.

Действие NOx сопровождалось снижением содержания ФТИ в печени крыс. Содержание ФТИ снижалось и в опухолевых клетках по мере роста КГ, а также при воздействии NOx на ранних сроках роста опухоли. Снижение содержания ФТИ может происходить как вследствие угнетения его синтеза так и усиления распада с образованием клеточных месенджеров диацилглицерола и инозитол-1,4,5-трифосфата. Диацилглицерол остается связанным с внутренним слоем плазматической мембраны, где он участвует в активации протеинкиназы С, увеличение активности которой связано с пролиферацией. Инозитол-1,4,5-трифосфат диффундирует в цитоплазму и связывается со специфическими рецепторами на эндотелиальном рети-

кулуме, вызывая выброс ионов Ca^{2+} .

Таким образом, установлено, что ингаляционное действие NOx стимулирует рост КГ на позднем этапе ее развития. При этом, в опухоли наблюдался рост соотношений β НТФ/ Φ н и Φ Кр/ Φ н, что свидетельствует об активации энергетического метаболизма. Параллельно наблюдалось снижение соотношения Φ МЭ/ β НТФ, что связано с уменьшением гипоксии, а снижение Φ тХ/ Σ М отображает уменьшение структуризации мембран. Действие NOx снижало уровень ФтС, ФТИ и повышало содержание кардиолипина в опухолевой ткани, что влияло на скорость пролиферации, апоптоз и дыхание клеток опухоли.

Выводы

1. Системное действие ОА на фоне развития КГ сопровождалось угнетением энергетического метаболизма, ускорением распада фосфолипидов, повышением уровня гипоксии и уменьшением структуризации мембран в печени крыс.
2. Однако в опухоли происходила активизация энергетического метаболизма, синтеза компонентов мембран, наблюдалось уменьшение гипоксии и структуризации мембран, что коррелировало с ускорением роста КГ.

Литература

1. Chekhun V.F. Phospholipids and cholesterol content in tumor cell plasma membranes with different sensitivity to doxorubicin / V.F.Chekhun, V.P.Tryndiak, I.M.Todor // *The Ukrainian Biochemical Journal*. - 2003. - Vol. 75, № 4. - P. 120-125.
2. Hussain S.P. Nitric oxide, a mediator of inflammation, suppresses tumorigenesis / S.P.Hussain, G.E.Trivers, L.J.Hofseth // *Cancer Res*. - 2004. - Vol. 64. - P. 6849-6853.
3. Iverson S.L. Cardioliipin is not required for Bax-mediated cytochrome c release from yeast mitochondria / S.L.Iverson, M.Enoksson, V.Gogvadze // *J. Biol. Chem*. - 2004. - Vol. 279, № 2. - P. 1100-1107.
4. Kisley L.R. Genetic ablation of inducible nitric oxide synthase decreases mouse lung tumorigenesis / L.R.Kisley,

B.S.Barrett, A.K.Bauer // *Cancer Res.* - 2002. - Vol. 62. - P. 6850-6856.

5. Koshkin V. *Cardiolipin prevents rate-dependent uncoupling and provides osmotic stability in yeast mitochondria* / V.Koshkin, M.L.Greenberg // *Biochem. J.* - 2002. - Vol. 364. - P. 317-322.

6. *Effect of environmental nitric oxides on antitumor resistance of rats* / V.M.Mikhailenko, Z.D.Savtsova, O.A.Glavin [e.a.] // *Exp. Oncol.* - 2005. - Vol. 27, №1. - P. 65-70.

7. Pacher P. *Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease* / P.Pacher, J.S.Beckman, L.Liaudet // *Physiol. Rev.* - 2007. - Vol. 87. - P. 315-424.

8. Ridnour L.A. *Nitric oxide regulates angiogenesis through a functional switch involving thrombospondin-1* / L.A.Ridnour, J.S.Isenberg, M.G.Espey // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* - 2005. - Vol. 102. - P. 13147-13152.

9. Siegert A. *Nitric oxide of human colorectal adenocarcinoma cell lines promotes tumour cell invasion* / A.Siegert, C.Rosenberg, W.D.Schmitt // *Br. J. Cancer.* - 2002. - Vol. 86. - P. 1310-1315.

10. Zwaal R. F. A. *Surface exposure of phosphatidylserine in pathological cells* / R.F.A.Zwaal, P.Comfurius, M.E.Bevers // *Cellular and Molecular Life Sciences.* - 2005. - Vol. 62, №9. - P. 971-988.

Резюме

Михайленко В.М., Елейко Л.О. Роль екзогенних оксидів азота в модуляції біоенергетичного статусу та рівня фосфоліпідів в нормальних і опухолевих тканинах.

В роботі вивчено вплив екзогенних оксидів азота (ОА) на енергетичний метаболізм, а також рівень фосфоліпідів та їх метаболітів в опухолі карциноми Герена (КГ) і печені крис методом ³¹P-ЯМР спектроскопії. Інгаляційна дія екзогенних ОА супроводжувалась зменшенням в 1,9 раза в печені та збільшенням в 3,5 раза в опухолі співвідношення βНТФ/Фн, характеризуючого рівень енергетичного метаболізму клітки. При цьому співвідношення фосфомоноестерів/βНТФ, що відображає рівень гіпоксії кліток, збільшувалось у печені і зменшувалось у пухлині. Вплив ОА супроводжувався також зниженням рівня фосфатидилхоліну/сфінгомеліну в клітинах пухлини і печінки. Вміст кардіоліпину підвищувався в пухлині і знижувався в печінці. Паралельно спостерігалось зменшення в 1,2 раза у тканині печінки і збільшення в 1,5 раза у пухлині співвідношення ФМЕ/ФДЕ на пізньому терміні розвитку КГ.

и печени. Содержание кардиолипина повышалось в опухоли и снижалось в печени. Параллельно наблюдалось уменьшение в 1,2 раза в ткани печени и увеличение в 1,5 раза в опухоли соотношения ФМЭ/ФДЭ на позднем сроке развития КГ.

Ключевые слова: экзогенные оксиды азота, биоэнергетический статус, фосфолипиды, карцинома Герена, крысы.

Резюме

Михайленко В.М., Елейко Л.О. Роль екзогенних оксидів азоту в модуляції біоенергетичного статусу та рівня фосфоліпідів в нормальних і пухлинних тканинах.

В роботі вивчено вплив екзогенних оксидів азоту (ОА) на енергетичний метаболізм, а також рівень фосфоліпідів та їх метаболітів у пухлині карциноми Герена (КГ) і печінці щурів методом ³¹P-ЯМР спектроскопії. Інгаляційна дія екзогенних ОА супроводжувалась зменшенням в 1,9 раза в печінці і збільшенням в 3,5 раза в пухлині співвідношення βНТФ/Фн, що характеризує рівень енергетичного метаболізму клітини. При цьому співвідношення фосфомоноестерів/βНТФ, що відображає рівень гіпоксії клітин, збільшувалось у печінці і зменшувалось у пухлині. Вплив ОА супроводжувався також зниженням рівня фосфатидилсерину, фосфатиділінозиту та зростанням співвідношення фосфатидилхоліну/сфінгомеліну в клітинах пухлини і печінки. Вміст кардіоліпину підвищувався в пухлині і знижувався в печінці. Паралельно спостерігалось зменшення в 1,2 раза у тканині печінки і збільшення в 1,5 раза у пухлині співвідношення ФМЕ/ФДЕ на пізньому терміні розвитку КГ.

Ключові слова: екзогенні оксиди азоту, біоенергетичний статус, фосфоліпіді, карцинома Герена, щури.

Summary

Mikhailenko V.M., Eleiko L.O. Role of exogenous nitric oxide in modulation of bioenergetic status and phospholipids level in normal and tumor tissues.

The effect of environmental NOs on the energy metabolism, level of phospholipids and theirs metabolites in Guerin's carcinoma (GC) and liver of rats it is studied by ³¹P-NMR spectroscopy in work. Inhalation of the exogenous NOs was followed by 1,9-fold decline in the βNTP/Pi ratio in liver and 3,5-fold rise in tumor, that reveal the level of energy metabolism. Correspondingly, the phosphomonoesters/βNTP ratio, that reflects the level of hypoxia, was increased in liver and decreased in tumor. Exposure to NOs was followed by decrease of the phosphatidylserine and phosphatidylinositol levels, increase of the phosphatidylcholine/sphingomyelin ratio in the liver and tumor cells. Cardiolipin content was elevated in tumor and declined in liver. Simultaneously, NOs caused 1,2-fold decline of the PME/PDE ratio in liver but 1,5-fold increase in tumor cells on the late period of GC development.

Key words: exogenous nitric oxide, bioenergetic status, phospholipids, Guerin's carcinoma, rats.

Рецензент: д.біол.н., с.н.с. Ж.М. Мінченко