

Reference

1. Breinek P., Bouda J. Determination of urea using diacetylmonooxim without deproteinization in a sulfuric acid medium // *Vnitř. Lek.* – 1970. – Vol.16, №2. – P. 188-192.
2. Doumas B., Watson W., Biggs H. Albumin standards and the measurement of serum albumin with bromocresol green // *Clin. Chim. Acta.* – 1971. – Vol.31, №1. – P. 87-96.
3. Fukuchi K., Okudaira N., Adachi K. et al. Antiviral and antitumor activity of licorice root extracts // *In Vivo.* – 2016. – Vol. 11-12, №30(6). – P. 777-785.
4. Hoekstra L.T., de Graaf W., Nibourg G.A. et al. Physiological and biochemical basis of clinical liver function tests: a review // *Ann. Surg.* – 2013. – Vol. 257, №1. – P. 27-36.
5. Kim W.R., Flamm S.L., Di Bisceglie A.M., Bodenheimer H.C. Serum activity of alanine aminotransferase (ALT) as an indicator of health and disease // *Hepatology.* – 2008. – Vol. 47, №4. – P. 1363-1370.
6. Kumar C.G., Mongolla P., Pombalaneth S. et al. Physicochemical characterization and antioxidant activity of melanin from a novel strain of *Aspergillus bridgeri* ICTF-201 // *Lett. Appl. Microbiol.* – 2011. – Vol. 53, №3. – P. 350-358.
7. Kurian N.K., Nair H.P., Bhat S.G. Evaluation of Anti-inflammatory property of Melanin from marine *Bacillus* sp BTCZ31 // *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research.* – 2015. – Vol. 8, Issue 3. – P. 251-255.
8. Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randal R.I. Protein measurement with Folin phenol reagent // *J. Biol. Chem.* – 1951. – Vol.193, №1. – P. 265-275.
9. Reitman S., Frankel S. A colorimetric method for the determination of serum glutamic oxalacetic and glutamic pyruvic transaminases // *Am. J. Clin. Pathol.* – 1957. – Vol.28, №1. – P. 56-63.
10. Sharma S., Rana S., Patil V. et al. Antioxidant and hepatoprotective effect of polyphenols from apple pomace extract via apoptosis inhibition and Nrf2 activation in mice // *Human and Experimental Toxicology.* – 2016. – Vol. 35. – P. 1264 - 1275.
11. Verneti L.A., Senutovitch N., Boltz R. et al. A human liver microphysiology platform for investigating physiology, drug safety, and disease models // *Experimental Biology and Medicine.* – 2016. – Vol. 241. – P. 101-114.
12. Weng S.F., Kai J., Guha I.N., Qureshi N. The value of aspartate aminotransferase and alanine aminotransferase in cardiovascular disease risk assessment // *Open Heart.* – 2015. – Vol. 2. – P. e000272.
13. Ye M., Wang Y., Guo G.Y., et al. Physicochemical characteristics and antioxidant activity of arginine-modified melanin from *Lachnum YM-346* // *Food Chem.* – 2012. – Vol. 135, №4. – P. 2490-2497.

Надійшла до редколегії 23.11.16

Е. Дворченко, д-р биол. наук., А. Драницина, канд. биол. наук., Е. Торгалло, канд. биол. наук., А. Короткий, канд. биол. наук., Т. Береговая, д-р биол. наук.
Киевский национальный университет им. Тараса Шевченко, Киев

ПОКАЗАТЕЛИ ПРОТЕИНОВОГО ОБМЕНА В КРОВИ КРЫС ПРИ ИЗУЧЕНИИ ХРОНИЧЕСКОЙ ТОКСИЧНОСТИ КОМПОЗИЦИИ НА ОСНОВЕ МЕЛАНИНА

Исследовано хроническую токсичность композиции на основе меланина на показатели протеинового обмена в сыворотке крови крыс обоих полов. Установлено, что при действии меланина в терапевтической дозе 0,3 мг·кг⁻¹ в течение 90 дней в сыворотке крови самцов и самок крыс концентрация общего белка, альбумина, мочевины и активность аланинаминотрансферазы и аспартатаминотрансферазы остается в пределах контрольных значений. Показано, что при действии меланина в десятикратной терапевтической дозе 3 мг·кг⁻¹ в течение 90 дней в сыворотке крови самок активность аланинаминотрансферазы увеличивается в 1,36 раза, все остальные исследуемые показатели у самцов и самок находятся на контрольном уровне.

Ключевые слова: хроническая токсичность, меланин, протеиновый обмен.

K. Dvorshchenko, DSc., A. Dranitsina, PhD., Ie. Torgalo, PhD., A. Korotkiy, PhD., T. Beregova, DSc.
Taras Shevchenko National University of Kyiv, Kyiv

INDICES OF PROTEIN METABOLISM IN BLOOD OF RATS IN THE STUDY OF CHRONIC TOXICITY BASED ON MELANIN

The chronic toxicity of the drug based on melanin was investigated on the basis of indices of protein metabolism in blood serum of rats of both sexes. It is found that by action of melanin in the therapeutic dose of 0.3 mg × kg⁻¹ during 90 days the concentration of total protein, albumin, urea, alanine aminotransferase and aspartate aminotransferase remained within the control values in the serum of male and female rats. It was shown that by action of melanin in ten-fold therapeutic dose of 3 mg × kg⁻¹ for 90 days serum alanine aminotransferase was 1.36 times higher of the control value in females; at the same time all other analyzed parameters remained at the control level in both males and females.

Key words: chronic toxicity, melanin, protein metabolism.

УДК 576.31.577.151.6

А. Білюк, асп., А. Негеля, асп., Л. Гарманчук, д-р биол. наук
Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Київ,
О. Скачкова, канд. биол. наук
Національний Інститут раку, Київ

АКТИВНІСТЬ ЦИТОХРОМОКСИДАЗИ ТА СУКЦИНАТДЕГІДРОГЕНАЗИ В ПЕРВИННІЙ КУЛЬТУРІ ПЕРЕЩЕПЛЮВАНОЇ КАРЦИНОМИ ЛЕГЕНЬ ЛЬЮЇС НА РІЗНИХ ЕТАПАХ РОСТУ ПУХЛИНИ

В клітинах первинної культури карциноми Льюїса активність цитохром оксидази на 14 добу росту первинної пухлини становила 2,4±0,15 мкмоль окисненого цит.с/мг·хв, на 25 добу даний показник знизився майже в 7 разів (p<0.01); активність сукцинатдегідрогенази на 25 добу знизилась до 21.7±2.3 мкмольK₃[Fe(CN)₆]/мг·хв., що у 1,6 разів менше, ніж сукцинатдегідрогеназна активність на 14 добу.

Ключові слова: цитохромоксидаза, сукцинатдегідрогеназа, карцинома легенів Льюїса, пухлина, рак, мітохондрія, окислювальний стрес, анеуплоїдія.

Вступ.

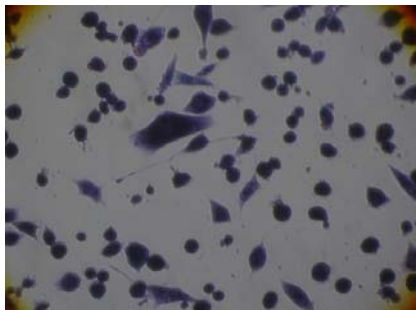
Найважливішими функціями мітохондрій є окиснення проміжних метаболітів вуглеводного, ліпідного та білкового обмінів, таких як піруват, жирні кислоти, ацетоацетат тощо, і використання енергії, що вивільнюється при розпаді цих сполук для біосинтезу АТФ. Інша важлива функція мітохондрій полягає у механізмах утворення апоптосом та запрограмованої смерті клітин [5, 9].

Мітохондріальні дисфункції, пов'язані з процесами окисного фосфорилування, структурною цілісністю мітохондрій та інформаційною ідентичністю їх генетичного апарату, виникають за умовоксидативного стресу, при хворобах, викликаних метаболічними порушеннями, а також канцерогенезі [5, 10]. Характерними ознаками трансформованих клітин є підвищення рівня активних форм кисню (АФК), неефективність транспорту електронів в дихальному ланцюзі, посилення метаболі-

зму, послаблення процесів нейтралізації АФК, онкоген-індукований реплікативний стрес (який проявляється у зупинці реплікації ДНК під впливом онкогенів та може призводити до нестабільності геному, анеуплоїдії, раку чи старіння клітини), зміни мітохондріальної динаміки. Невідворотні порушення і структури та функціонуванні мітохондрій, спричинені дією надмірних кількостей АФК, зумовлюють зсув енергетичного метаболізму в бік зростання інтенсивності гліколізу та пригнічення окисного фосфорилування [4]. Основними маркерними ферментами, задіяними в порушенні окисного фосфорилування, є сукцинат-дегідрогеназа (СДГ) та цитохромоксидаза (ЦО). Зміна активності цих ферментативних систем спряжені також із порушеннями регуляції клітинного циклу [10]. А нечутливість пухлинних клітин до проапоптотичних стимулів корелюють із наростанням анеуплоїдії [3]. Тому, метою нашого дослідження було визначення активності СДГ та ЦО на моделі первинної культури карциноми легень Льюїс, виділеної з пухлин на різних етапах їх росту.

Матеріали та методи. Отримання первинної культури із перещеплюваної карциноми легень Льюїс. Для

отримання первинної культури клітин проводили послідовну трипсинізацію вилученої від мишей С57Black пухлини на 14 та 25 добу після інокуляції пухлинних клітин в стежний м'яз. Для цього в стерильних умовах пухлини вилучали, відмивали в фосфатно-сольовому буфері, подрібнювали та поміщали в розчин 0,12% трипсину. Дезінтеграцію тканини проводили при 37°C при постійному помішуванні на магнітній мішалці протягом 15 хвилин, після чого відбиралася осад, в який додавали сироватку для інактивації дії трипсину. Клітини центрифугували, осад перерозчиняли в середовищі Ігла, підраховували співвідношення живих та мертвих клітин та повторювали процедуру виділення клітин. Четверта порція виділених клітин містила найменшу кількість мертвих клітин, тому в подальшому вона була використана для культивування в первинній у культурі. Пухлинні клітини субкультивували в середовищі RPMI (Sigma, США) з додаванням 10% ембріональної телячої сироватки (Sigma, США), 2 мМ L-глутаміну та 40 мкг/мл гентаміцину при 37°C у вологих умовах, 5% CO₂ (рис.1).



А



Б

Рис. 1. Морфологічні особливості клітин первинних культур карциноми Льюїс, виділених на 14 (А) та 25 (Б) добу після її перещеплення (Х200)

Вимірювання рівня апоптозу та вмісту анеуплоїдних та диплоїдних клітин.

Визначення біологічних властивостей клітин первинної культури проводили за рівнем апоптозу вмістом анеуплоїдних та диплоїдних клітин [7].

Клітини для аналізу рівня апоптозу фарбували флюорохромним барвником прорідий йодистим (PI), що селективно з'єднується з інтеркалюючими сайтами в ДНК. Метод визначення рівня апоптозу базується на відомому факті втрати клітинами в процесі програмованої клітинної загибелі частини ДНК внаслідок її міжнуклеосомної фрагментації.

Фарбування клітин за допомогою флюорохромного барвника PI включало наступні етапи: клітини у кількості 1×10^5 на пробу після однократного відмивання в 5 мл PBS при 1000 об/хв протягом 10 хв ресуспендували в 1 мл гіпотонічного лізуючого буфера (0,1 % цитрат натрію, 0,1 % Triton X-100, 5 мкг/мл PI). Всі реагенти фірми "Sigma Chemical Co", США. Після обережного струшування, клітини інкубували при 22-25 °C протягом 30 хв у темряві. Визначення вмісту анеуплоїдних клітин проводили за обрахуванням гістограм в гіподиплоїдній області.

Цитометричний аналіз проводили на приладі FACS Calibur ("Becton Dickinson", США), що оснащений двома лазерами (з $\lambda = 488$ та 625 нм), з використанням спеціалізованих математичних програм CellQuest та ModFit LT 2.0 (BDIS, США) для комп'ютерів Macintosh для отримання та аналізу даних. Для виміру флуоресценції PI використовували вузькосмуговий фільтр 585/42 нм.

Виділення мітохондрій із клітин первинної культури карциноми легень Льюїс.

Для отримання мітохондрій, клітини концентрували шляхом центрифугування при 1000g протягом 10 хв. У суспензії вимірювали кількість клітин та їхню життєздатність за допомогою камери Горяєва з використанням 0,4% розчину трипанового синього, приготованого на фосфатно-сольовому буфері. Процедuru виділення проводили, використовуючи попередньо охолоджені реактиви, посуд та інструменти. Надалі клітини поміщали у 10 мл середовища виділення I (250 мМ сахароза, 3 мМ трилон Б, 20 мМ трис-НСІ (рН 7,4 при 4°C)). Далі проводили гомогенізацію на гомогенізаторі Патерсона для руйнування плазматичних мембран клітин. Після центрифугування на холоді при 600g протягом 20 хв для видалення ядер та уламків клітин, супернатант обережно відбирали, профільтрували через 3 шари марлі. Потім знову центрифугували при 11000g 20 хв при 4°C, а отриманий осад ресуспендували в середовищі виділення II (250 мМ сахароза, 30 мМ трис-НСІ (рН 7,4 при 4°C) в об'ємі 1мл. Для одержання субмітохондріальних частинок (СМЧ) проводили процедуру дворазового заморожування-відтаювання суспензії мітохондрій, що призводило до порушення цілісності мітохондрій [11, 12]. Після відтаювання, суспензію гомогенізували в невеликому об'ємі середовища II, поступово доводили об'єм середовища II до 50 мл і центрифугували при 25000-27000 g 30 хв. Осад, який містив фракцію СМЧ (везикули внутрішньої мембрани мітохондрій), ресуспендували в невеликому об'ємі середовища II і надалі використовували для досліджень. Аналіз чистоти СМЧ

проводили біохімічним методом, оцінюючи активність 5'-нуклеотидази (5'-рибонуклеотид-фосфогідролаза, КФ 3.1.3.5.) – маркерний фермент плазматичної мембрани згідно [12], та сукцинатдегідрогенази (сукцинат:оксидоредуктаза, КФ 1.3.99.1.) – маркерний фермент внутрішньої мембрани мітохондрій [12].



До суспензії мітохондріальних мембран в об'ємі, що містив 0,2 мг білка, додавали середовище інкубації (10 мМ фосфатний буфер (рН=7,8), 5 мМ бурштинову кислоту, 1,25 мМ ЕДТА, 7,5 мМ азид натрію). Проби інкубували при кімнатній температурі протягом 5 хв для інгібування цитохромоксидази азидом натрію. Реакцію розпочинали додаванням до проб 1,25 мМ розчину фериціаніду калію. Проби інкубували протягом 10 хв при +30°С.

Після інкубації реакцію зупиняли зниженням температури проб до 0°С шляхом опускання проб улід і додаванням 0,1% додецилсульфату натрію (ДСН). В контрольні проби, які містили всі компоненти інкубаційної суміші, ДСН додавали перед внесенням суспензії мітохондріальних мембран. Після зупинки реакції і охолодження проби фотометрували на спектрофотометрі СФ-46 при довжині хвилі $\lambda = 420$ нм проти дистильованої H_2O . Для визначення вмісту фериціаніду в пробах, що містили від 100 до 1000 мкг фериціаніду в 4 мл розчину, будували калібрувальну криву. За різницею в показниках екстинції ($E_{\text{пр}} - E_{\text{к}}$), застосовуючи калібрувальну криву, розраховували кількість фериціаніду, який відновлювався за час інкубації. Активність сукцинатдегідрогенази в препаратах мітохондрій збільшувалася в середньому в 6-7 разів порівняно з гомогенатами, що свідчить про достатній ступінь їх чистоти.

Визначення активності цитохромоксидази. Цитохромоксидаза (КФ 1.9.3.1.) є термінальним ферментом дихального ланцюга, який безпосередньо взаємодіє з киснем. Окиснена форма цитохромоксидази (Fe^{2+}) приймає електрони від відновленого цитохрому с, переходячи у відновлену форму (Fe^{3+}). Метод визначення активності ЦО [2] оснований на окисненні цитохрому с цитохромоксидазою.

До середовища інкубації, що складалось з: 20 мМ калій-фосфатного буферу (рН 7,2) та 50 мкМ цитохрому с, вносили суспензію СМЧ з вмістом білка 0,2 мг. В одну паралель реакційного середовища додавали

Визначення активності сукцинатдегідрогенази. Визначення активності СДГ проводили згідно методу [12], принцип якого полягає у відновленні фериціаніду калію ($\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$) до фероціаніду калію ($\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$) сукцинатом за участі ферменту. Активність визначали за кількістю відновленого фериціаніду. Реакція протікає за наступною схемою:

25 мМ NaN_3 (інгібітору цитохромоксидази). Реакції розпочинали внесенням 2 мМ НАДН. Реакційну суміш інкубували при кімнатній температурі протягом 3 хв. Проби фотометрували на спектрофотометрі СФ-46 при довжині хвилі $\lambda = 550$ нм проти дистильованої H_2O .

Активність розраховували в мкмоль хцитохрому с, окисненого за час інкубації за хвилину на 1 мг білка:

$$A = (V \times \Delta \epsilon) \div (K \times c \times L)$$

де V – загальний об'єм проби; $\Delta \epsilon$ – різниця екстинцій ($E_{\text{к}} - E_{\text{пр}}$), одиниці оптичної щільності; K – мілімолярний десятковий коефіцієнт поглинання цитохрому с ($21.0 \text{ мМ}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$); c – вміст білка в пробі, мг; L – довжина оптичного шляху, см ($L = 1$ см); t – час інкубації проби, хв.

Концентрацію білка визначали за методом Бретфорда [1].

Статистичну обробку результатів проводили з використанням "Origin 6,1" і t-критерія Стюдента. Всі дані приведені у вигляді середніх арифметичних та стандартних відхилень.

Результати та їх обговорення.

Виділення та аналіз первинної культури перещеплюваної карциноми легень Льюїс із пухлини проводили на 14 та 25 добу після її перещеплення експериментальним тваринам. Ці терміни було відібрано з метою визначення біологічних властивостей пухлинних клітин на початковому етапі метастазування (14 доба) та на етапі формування метастазів васкулярної фази (25 доба) [8]. Згідно морфологічного аналізу представленого на типовому фото (рис. 1), на 25 добу виявлено переважання субпопуляції клітин меншого розміру та з більшим ядерно-цитоплазматичним відношенням. Окрім цього, спостерігається переважання анеуплоїдних клітин. При цитофлуориметричному аналізі в популяції первинної культури, виділеної на 25 добу вміст анеуплоїдних клітин переважав аналогічний на 14 добу в 1,6 рази ($p < 0.05$, рис. 2).

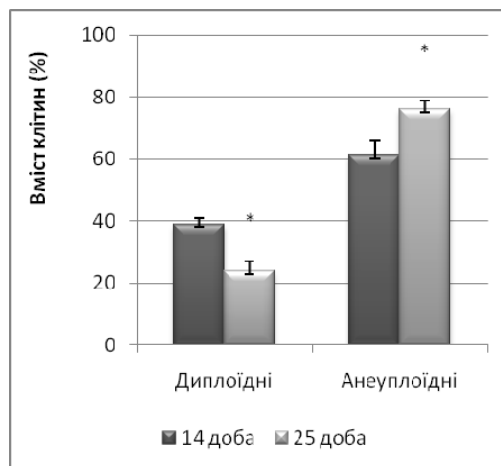


Рис. 2. Вміст диплоїдних та анеуплоїдних клітин в первинній культурі карциноми Льюїс, виділених на 14 та 25 добу після її перещеплення.

* – різниця достовірна ($p < 0.05$)

При аналізі рівня апоптичних клітин було виявлено, що на 25 добу цей показник був меншим, ніж на 14 добу (рис.3), що могло бути асоційовано із змен-

шенням чутливості первинної культури на 25 добу до проапоптичних стимулів, пов'язаної з переважанням анеуплоїдних клітин.

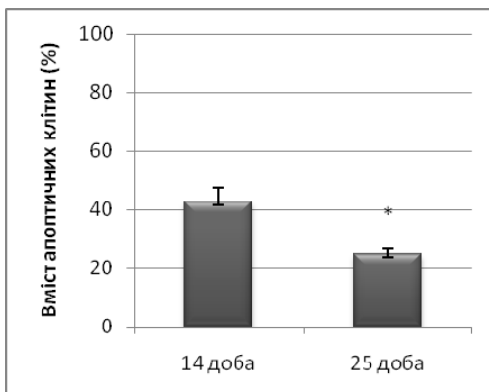


Рис. 3. Рівень апоптичних клітин в первинній культурі карциноми Льюїс, виділених на 14 та 25 добу після її перещеплення.

* – різниця достовірна ($p < 0.05$)

При визначенні активності СДГ та ЦО в мітохондріях, виділених із первинної культури карциноми Льюїс на 14 та 25 добу після її перещеплення було виявлено односпрямоване зменшення активності цих ферментів на 25 добу, порівняно з 14 добою. Так, на 14 добу активність ЦО становила $2,4 \pm 0,15$ мкмоль окисненого цит.с/мг*хв., тоді як на 25 добу даний показник знизився майже в 7 разів ($p < 0.01$, рис.4А), порівняно з 14 добою і склав $0,34 \pm 0,17$ мкмоль окисненого цит.с/мг*хв. Щодо

показників сукцинатдегідрогеназної активності, то вона також зменшувалася в первинній культурі, виділеній на 25 добу порівняно з 14 добою, однак не так виражено (рис.4Б). Було встановлено, що на 14 добу її активність складала $36,6 \pm 3,4$ мкмоль $K_3[Fe(CN)_6]$ /мг*хв, тоді як на 25 добу цей показник знизився до $21,7 \pm 2,3$ мкмоль $K_3[Fe(CN)_6]$ /мг*хв, що у 1,6 разів менше, ніж СДГ активність на 14 добу.

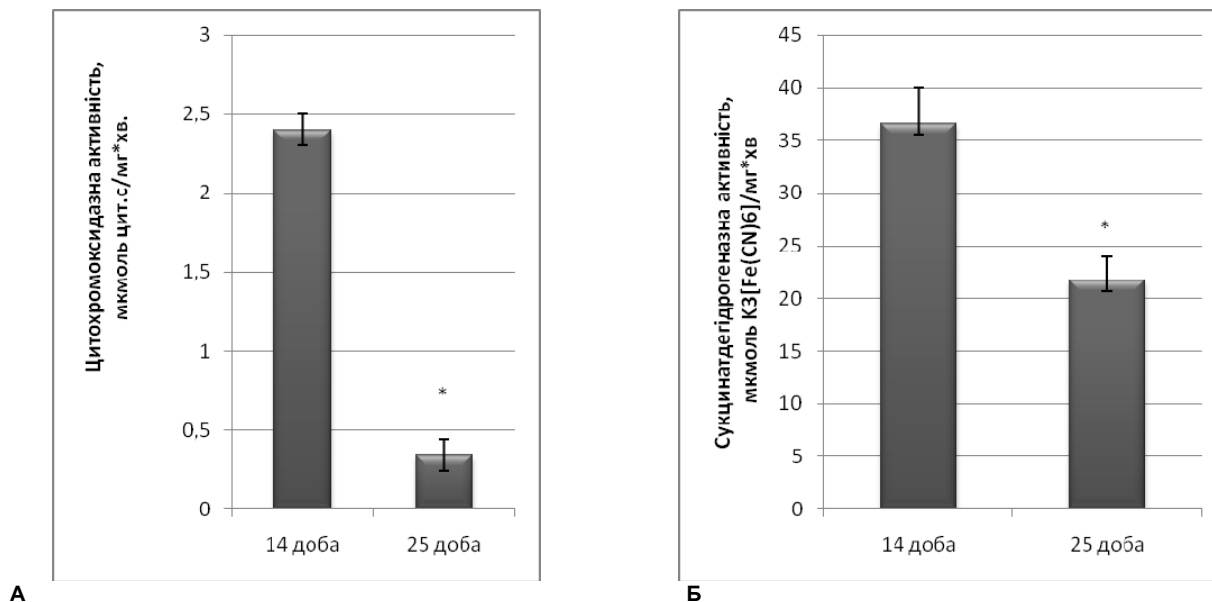


Рис. 4. Активність мітохондріальних ферментів в первинній культурі перещеплюваної карциноми легень Льюїс на 14 та 25 добу:

А – цитохромоксидазна активність (мкмольцит.с/мг*хв.);

Б – сукцинатдегідрогеназна активність (мкмоль $[Fe(CN)_6]$ /мг*хв). * -різниця достовірна ($p < 0.05$)

Таким чином, проведені дослідження на первинній культурі карциноми легень Льюїс вказує на наростання пулу анеуплоїдних клітин в популяції зі збільшенням терміну росту пухлини. На етапі активного метастазування в легені (25 добу після перещеплення) та формування метастазів васкулярної фази виявлено значне переважання анеуплоїдних клітин, які менш чутливі до апоптичних стимулів, про що свідчать дані рівня апоп-

тичних клітин: даний показник зменшується на 25 добу, порівняно з 14 добою в 1,6 рази. При визначенні активності ключових мітохондріальних ферментів – сукцинатдегідрогенази та цитохром оксидази виявлено зниження їх активності на 25 добу, порівняно з 14 добою. Такий ефект зумовлений гіпоксією, яка властива пухлині даної експериментальної моделі на 25 добу після перещеплення, що призводить до пригнічення системи

ферментів окисного фосфорилування та переважного переходу пухлинних клітин на гліколітичне анаеробне поповнення енергетичних субстратів.

Список використаних джерел

1. Bradford, M. M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding // *Bradford, M. M. // Analytical Biochemistry*. – 1976. – №72, – P. 248-254.
2. Francois M. Isolementet Proprietes des Membranes Externes et Internes de Mitochondries Vegetales / Francois M., Claude L. // *Biochimie*. – 1972. – №54. – P.1335-1348.
3. Gentric, G. Oxidative stress promotes pathologic polyploidization in nonalcoholic fatty liver disease /Gentric, G., Maillat, V., Paradis, V. et al. // *The Journal of clinical investigation*. – 2015. – №125(3). – P. 981-992.
4. Gorrini C. Modulation of oxidative stress as an anticancer strategy /Gorrini C., Harris I., Mak T. // *Nature Reviews Drug Discovery*. – 2013. – № 12. – P. 931-947.
5. Lee J. Autophagy, mitochondria and oxidative stress: cross-talk and redox signaling /Lee J., Giordano S., Zhang J. // *Biochemical Journal*. – 2012. – № 441(2). – P. 523-540.
6. Navarro-Yepes J. Oxidative Stress, Redox Signaling, and Autophagy: Cell Death Versus Survival /Navarro-Yepes J, Burns M, Anandhan A, et al. // *Antioxidants & Redox Signaling*. – 2014. – №21(1). – P.66-85.
7. Nicoletti I. A rapid and simple method for measuring thymocyte apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry/ Nicoletti I. // *Journal Immunology Methods*. – 1991. – №139. – P. 271-80.
8. Pyaskovskaya O. Changes in VEGF level and tumor growth characteristics during lewis lung carcinoma progression towards cis-DDP resistance /Pyaskovskaya O., Dasyukevich O., Kolesnik D. // *Experimental Oncology*. – 2007. – №29(3). – P. 197-202.
9. Scatena R. Mitochondria and Cancer: A Growing Role in Apoptosis, Cancer Cell Metabolism and Dedifferentiation /Scatena R. // *Advances in Experimental Medicine and Biology*. – 2012. – № 942. – P. 287-308.
10. Sinha, K. Oxidative stress: the mitochondria-dependent and mitochondria-independent pathways of apoptosis /Sinha, K., Das, J., Pal, P.B. et al. // *Archive Toxicology*. – 2013. – №87:1157.
11. Vyas S. Mitochondria and Cancer /Vyas S., Zaganjor E., Haigis M. // *Cell*. – 2016. – № 166(3). – P. 555-566.
12. Ещенко Н. Определение количества янтарной кислоты и активности сукцинатдегидрогеназы / Ещенко Н.Д., Вольский Г.Г., // *Методы биохимических исследований (липидный и энергетический обмен)*. – Л: Из-во Ленингр. ун та, 1982. – С.207-212.

Reference

A. Билук, асп., А. Негеля, асп., Л. Гарманчук, д-р биол. наук
Киевский национальный университет имени Тараса Шевченко, Киев, Украина,
О. Скачкова, канд. биол. наук
Национальный Институт рака, Киев, Украина

АКТИВНІСТЬ ЦИТОХРОМОКСИДАЗИ І СУКЦИНАТДЕГІДРОГЕНАЗИ В ПЕРВИЧНОЇ КУЛЬТУРИ ПРЕВИТОЇ КАРЦИНОМИ ЛЕГКИХ ЛЬЮИС НА РІЗНИХ ЕТАПАХ РОСТА ОПУХОЛИ

В клетках первичной культуры карциномы Льюис активность цитохромоксидазы на 14 сутки составляла $2,4 \pm 0,15$ мкмоль окисленного цит.с/мг*мин, на 25 сутки данный показатель снизился почти в 7 раз ($p < 0,01$); активность сукцинат дегидрогеназы на 25 сутки снизилась до $21,7 \pm 2,3$ мкмоль $K_3Fe(CN)_6$ /мг*мин, что в 1,6 раза меньше, чем сукцинатдегидрогеназа активность на 14 сутки.

Ключевые слова: цитохромоксидаза, сукцинатдегидрогеназа, карцинома легких Льюиса, опухоль, рак, митохондрия, окислительный стресс, анеуплоидия.

A. Biluk, Phd stud., A. Nehelia, PhD stud., L. Garmanchuk, DSc
Taras Shevchenko National University of Kyiv, Kyiv, Ukraine,
O. Skachkova, PhD
National Cancer Center, Kyiv, Ukraine

THE ACTIVITY OF SUCCINATEDEHYDROGENASE AND CYTOCHROME OXIDASE IN PRIMARY CULTURE IN OCULATED LEWIS LUNG CARCINOMA IN VARIOUS STAGES OF TUMOR GROWTH

It was established that cytochromeoxidase activity of Lewis carcinomaprimary culture at 14th day was $2,4 \pm 0,15$ mmolcyt.c/mg*min, and it was decrease dalmostat 7-fold ($p < 0,01$) at 25th day, where as succinate dehydrogenase activity at 25th day was decreased to $21,7 \pm 2,3$ mmol $K_3Fe(CN)_6$ /mg*min, which was at 1.6 fold less than at 14th day.

Keywords: cytochrome oxidase, succinate dehydrogenase, Lewis lung carcinoma, tumor, cancer, mitochondria, oxidative stress, aneuploidy.

1. Bradford, M. M. Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding // *Analytical Biochemistry*. – 1976. – №72, – P. 248-254.

2. Francois M., Claude L. Isolementet Proprietes des Membranes Externes et Internes de Mitochondries Vegetales // *Biochimie*. – 1972. – №54. – P.1335-1348.

3. Gentric, G., Maillat, V., Paradis, V. et al. Oxidative stress promotes pathologic polyploidization in nonalcoholic fatty liver disease // *The Journal of clinical investigation*. – 2015. – №125(3). – P. 981-992.

4. Gorrini C., Harris I., Mak T. Modulation of oxidative stress as an anticancer strategy // *Nature Reviews Drug Discovery*. – 2013. – № 12. – P. 931-947.

5. Lee J., Giordano S., Zhang J. Autophagy, mitochondria and oxidative stress: cross-talk and redox signaling // *Biochemical Journal*. – 2012. – № 441(2). – P. 523-540.

6. Navarro-Yepes J, Burns M, Anandhan A, et al. Oxidative Stress, Redox Signaling, and Autophagy: Cell Death Versus Survival // *Antioxidants & Redox Signaling*. – 2014. – №21(1). – P.66-85.

7. Nicoletti I. A rapid and simple method for measuring thymocyte apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry // *Journal Immunology Methods*. – 1991. – №139. – P. 271-80.

8. Pyaskovskaya O., Dasyukevich O., Kolesnik D. Changes in VEGF level and tumor growth characteristics during lewis lung carcinoma progression towards cis-DDP resistance // *Experimental Oncology*. – 2007. – №29(3). – P. 197-202.

9. Scatena R. Mitochondria and Cancer: A Growing Role in Apoptosis, Cancer Cell Metabolism and Dedifferentiation // *Advances in Experimental Medicine and Biology*. – 2012. – № 942. – P. 287-308.

10. Sinha, K., Das, J., Pal, P.B. et al. Oxidative stress: the mitochondria-dependent and mitochondria-independent pathways of apoptosis // *Archive Toxicology*. – 2013. – №87:1157.

11. Vyas S., Zaganjor E., Haigis M. Mitochondria and Cancer // *Cell*. – 2016. – № 166(3). – P. 555-566.

12. Ещенко Н.Д., Вольский Г.Г., Определение количества янтарной кислоты и активности сукцинатдегидрогеназы // *Методы биохимических исследований (липидный и энергетический обмен)*. – Л: Из-во Ленингр. ун та, 1982. – С.207-212.

Надійшла до редколегії 28.11.16

Стаття Білук та співавтори виконана за часткової фінансової підтримки гранту 0114U003877 "Альтернативні моделі для тестування клітинних препаратів на онкогенність" Відділення цільової підготовки Київського національного університету імені Тараса Шевченка при Національній Академії наук України