



Вплив лазерного опромінення на ксантиноксидазну активність та генерацію супероксидного радикала в цитозольній фракції печінки щурів-пухлиноносіїв

О. В. Кеца, Н. Б. Куцак, М. М. Марченко

o.ketsa@chnu.edu.ua

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

Механізми протипухлинної дії лазерного опромінення і його вплив на біохімічні процеси у віддалених органах організму-пухлиноносія залишаються не до кінця зрозумілими. У роботі досліджено ензимну активність ксантиноксидази, зокрема її D- та O-форми, а також швидкість генерації супероксидного радикала (O_2^-) та рівень білкових SH-груп в цитозольній фракції печінки щурів з трансплантованою карциномою Герена і за дії лазерного опромінення у ближньому інфрачервоному діапазоні довжин хвиль. Встановлено, що в цитозольній фракції щурів-пухлиноносіїв знижується ензимна активність D-форми ксантиноксидази з одночасним підвищенням її O-форми у період інтенсивного (14-а доба, що відповідає логарифмічній фазі онкогенезу) та кінцевого (21-а доба, що відповідає стаціонарній фазі онкогенезу) росту пухлини. Підвищення активності O-форми ксантиноксидази супроводжується підвищенням швидкості генерації O_2^- та зниженням рівня білкових SH-груп в цитозольній фракції печінки щурів-пухлиноносіїв. Щоденна спрямована дія лазерного опромінення в ділянку росту карциноми Герена призводить до менш деструктивних змін в печінці, про що свідчить підвищення ензимної активності D-форми ксантиноксидази, зниження швидкості утворення O_2^- і підвищення вмісту білкових SH-груп в цитозольній фракції печінки експериментальних тварин порівняно з неопроміненими щурами-пухлиноносійми. Дія лазерним діодом в червоному діапазоні спектра потужністю 50 мВт і довжиною хвилі 650 нм на ділянку росту пухлини супроводжується зниженням окиснювальних процесів у цитозолі клітин печінки організму-пухлиноносія.

Ключові слова: щури, цитозольна фракція печінки, ксантиноксидаза, супероксидний радикал, сульфгідрильні групи, карцинома Герена, лазерне опромінення

Застосування лазерного опромінення в медицині та косметології може проявляти як позитивний, так і негативний вплив на організм людини. Це обумовлено як безпосередньою дією лазерного опромінення на тканину, так і вторинними ефектами. Сьогодні дедалі більшого значення набуває застосування лазерного опромінення в онкології [1], однак питання механізмів його протипухлинної дії та можливі ефекти на органи, не залучені до пухлинного процесу, залишаються відкритими. Окрім того, ріст і розвиток злоякісного новоутворення в організмі може впливати на функціонування віддалених органів, зокрема печінки [10].

Один із механізмів дії лазерного опромінення — активація металовмісних ензимів. Один фотон променя лазерного діоду може активувати одну молекулу ензиму, а остання може впливати на інші молекули [8]. За цих умов активується каскад біохімічних реакцій і відбувається синтез багатьох молекул субстрату, що лежить в основі підвищення біологічної відповіді клітин на лазерне опромінювання. Одним із цитоплазматичних ензимів клітини, активність якого може змінювати-

ся за умов лазерного опромінення, є ксантиноксидаза. Ксантиноксидаза (КФ 1.17.3.2) каталізує реакцію окислення гіпоксантину до ксантину та сечової кислоти і бере участь в генерації активних форм кисню (АФК), а саме супероксидного аніон-радикала (O_2^-) [11].

У тканинах печінки ксантиноксидаза існує в двох формах: оксидазній (O-форма) і дегідрогеназній (D-форма), які, у свою чергу, діють як акцептор електронів і NAD^+ . Саме O-форма ксантиноксидази відіграє важливу роль у процесах окисного ураження клітин, тоді як D-форма має антиоксидантні властивості і бере участь у захисті клітини від кисневих радикалів. Залежно від зовнішніх факторів, D-форма ксантиноксидази може перетворюватися в O-форму, що ініціюватиме вільнорадикальні процеси в клітинах печінки [14].

Мета роботи — оцінити вплив лазерного опромінення на ферментативну активність D- та O-форми ксантиноксидази і генерацію супероксидного радикала в цитозольній фракції печінки щурів з трансплантованою карциномою Герена.

Матеріали і методи

Дослідження проводили на 36 білих безпородних щурах-самках масою 120–150 г. Усіх експериментальних тварин утримували у стандартних санітарних умовах, а маніпуляції з тваринами проводили відповідно до Міжнародних вимог щодо гуманного ставлення до тварин та з виконанням вимог Директив 86/609/ЄЕС, які вказують на питання захисту тварин (Протокол №2 від 29.09.2020 року Комітету з Біоетики Інституту біології, хімії та біоресурсів Чернівецького національного університету імені Юрія Федьковича). Як модель злоякісного новоутворення використовували штам карциноми Герена, наданий нам Інститутом експериментальної патології, онкології і радіобіології імені Р. Є. Кавецького НАН України з «Банку штамів пухлин людини і тварин». Трансплантацію новоутворення здійснювали підшкірним введенням 0,5 мл 30% суспензії ракових клітин у фізрозчині в ділянку стегна правої кінцівки. Тварин було поділено на такі групи:

I — щури, яких щоденно протягом 4-х хвилин опромінювали лазерним діодом у ділянку стегна правої кінцівки ($n=9$);

II — щури з карциномою Герена (дослідний контроль) ($n=9$);

III — щури-пухлиноносії, які, починаючи від латентної фази онкогенезу, щоденно протягом 4 хв. зазнавали дії лазерного діоду у ділянку росту пухлини (стегно правої кінцівки) ($n=9$).

Контролем слугували інтактні тварини.

Опромінення здійснювали лазерним діодом в червоному діапазоні спектра потужністю 50 мВт і довжиною хвилі 650 нм через шкіру в ділянку росту пухлини. Проникна здатність лазерного опромінення збільшується від ультрафіолетового до помаранчевого діапазону — від 20 мкм до 2,5 мм, з різким збільшенням у червоному діапазоні — до 20–30 мм.

Евтаназію щурів здійснювали під легким ефірним наркозом у логарифмічну (14-а доба) та стаціонарну (21-а доба) фази онкогенезу.

Визначення ензимної активності ксантиноксидази проводили в цитозольній фракції, яку отримували після виділення диференційним центрифугуванням мікросомної фракції.

Ензимну активність ксантиноксидази визначали за кількістю утвореної сечової кислоти та виражали в мкмоль/хв на мг протеїну [13]. Дослідження D- та O-форм ксантиноксидази проводили паралельно. Для визначення активності D-форми до досліджуваної суміші додавали 100 мк/л 0,15 ммоль/л NAD^+ . Результати активності O-форми розраховували як різницю між загальною активністю ксантиноксидази і активністю її D-форми [12]. Визначення вмісту білкових SH-груп в цитозольній фракції печінки проводили з використанням реагенту Елмана та виражали в нмоль/мг протеїну [9].

Швидкість утворення O_2^- визначали за відновленням нітросинього тетразолію (НСТ) до гідразин тетразолію, який дає забарвлення з максимумом поглинання при довжині хвилі 540 нм, і виражали в нмоль/хв на мг протеїну [7]. Вміст білка в пробах визначали за методом Лоурі [6]. Статистичну обробку результатів здійснювали із застосуванням t -критерію Стьюдента. Різницю між групами вважали вірогідною за коефіцієнту вірогідності $P<0,05$.

Результати й обговорення

Один із механізмів дії лазерного опромінення — біохімічні зміни у тканинах безпосередньо в місцях опромінення. Ці зміни суттєво залежать від дози опромінення. Високі дози цілеспрямованого лазерного опромінення можуть бути основою деструктивних процесів у тканинах, що проявляється у різноманітних функціональних порушеннях рефлексорного характеру [2, 3]. Однак ця ж обставина може лежати в основі протипухлинної дії лазерного опромінення, внаслідок чого знижуватиметься вплив росту новоутворення на інші органи організму, зокрема печінку.

Результати проведених досліджень показали, що ріст в організмі карциноми Герена має негативний вплив на печінку. У щурів-пухлиноносіїв в міру росту в організмі новоутворення у печінці знижується ензимна активність дегідрогеназної форми ксантиноксидази з мінімальними показниками на 21-у добу онкогенезу, коли зазначений показник знижується у 2 рази порівняно з нормою (рис. 1).

Оскільки D-форма ксантиноксидази бере участь у синтезі сечової кислоти — потенційного антиоксиданту, що належить до важливих компонентів системи захисту клітин від кисневих радикалів, її зниження свідчить про порушення прооксидантно-антиоксидантного стану в клітинах печінки. Іншою причиною зниження ферментативної активності D-форми ксантиноксидази може бути її перехід в O-форму [14]. Щоб перевірити це припущення, ми дослідили активність O-форми ксантиноксидази за умов онкогенезу.

Встановлено, що вже у період активного росту в організмі карциноми Герена у печінці в 1,4 раза підвищується ферментативна активність O-форми ксантиноксидази (рис. 2). Зазначені зміни посилюються у стаціонарній фазі онкогенезу, коли досліджуваний показник у 2,9 раза перевищує значення інтактних тварин (рис. 2).

Зниження ферментативної активності D-форми ксантиноксидази за умов онкогенезу пов'язане з окисленням вільних сульфгідрильних груп ензиму, що сприяє його переходу в оксидазну форму [4]. Підвищення активності O-форми ксантиноксидази в цитозолі клітин печінки може свідчити про порушення печінки, оскільки ця ізоформа має прооксидантні властивості і здатна генерувати супероксидний радикал.

Відомо, що ксантиноксидаза належить до молібденовмісних ензимів [14], тому її активність може ініціюватися за дії квантів лазерного опромінення.

Семиденне опромінення щурів лазерним діодом у ділянку росту пухлини не призводить до змін O-форми ксантиноксидазної активності (рис. 2) з одночасним підвищенням її D-форми (рис. 1). Очевидно, кванти червоного спектра світла деструктивно впливають на трансформовану тканину, при цьому знижується її вплив на віддалені органи, зокрема печінку.

Після 14-денного опромінення спостерігається підвищення активності O-форми ксантиноксидази, однак зазначений показник не досягає значень неопромінених пухлиноносіїв (рис. 2). Встановлений факт може свідчити про окиснення сульфгідрильних груп активного центру ензиму, через що на цьому етапі відбувається посилення оксидазної активності та генерація супероксидного радикала. В результаті цього D-форма переходить в O-форму [4].

Аналізуючи результати визначення вільних білкових сульфгідрильних груп, ми встановили, що за росту в організмі новоутворення в цитозолі клітин печінки знижується рівень білкових SH-груп (рис. 3), що узгоджується зі зниженням активності D-форм ксантиноксидази (рис. 1) та підвищенням активності її О-форми (рис. 2), здатної генерувати супероксидний аніон-радикал.

Оскільки на кожен мономер ксантиноксидази припадає одна молекула FAD, що знешкоджує супероксид, і 8 атомів заліза у складі залізо-сірчаних кластерів, які генерують його, у зв'язку з цим аніон-радикал може утворюватися в надлишку [14]. У наших дослідженнях встановлено, що підвищення активнос-

ті О-форми ксантиноксидази супроводжується підвищенням генерації супероксидного радикала у цитозольній фракції печінки неопромінених щурів-пухлиноносіїв (рис. 4).

До утворення супероксидного аніон-радикала призводить відновлення кисню у флавіновому центрі ензиму. Через високу реакційну здатність супероксидного радикала він може перетворюватися в гідроксильний радикал і незворотно руйнувати білки, ліпіди й нуклеїнові кислоти. Встановлено, що підвищення кількості активних форм кисню не тільки індукує процеси вільнорадикального пероксидного окислення ліпідів, а й провокує пошкодження ДНК, що супроводжується виникненням точкових мутацій [5].

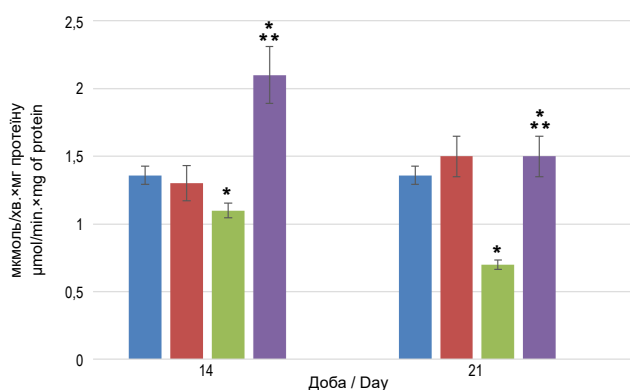


Рис. 1. Ферментативна активність D-форми ксантиноксидази у цитозольній фракції печінки щурів за дії лазерного опромінення

Fig. 1. The enzymatic activity of the D-form of xanthine oxidase in the liver cytosolic fraction of tumor-bearing rats under laser irradiation

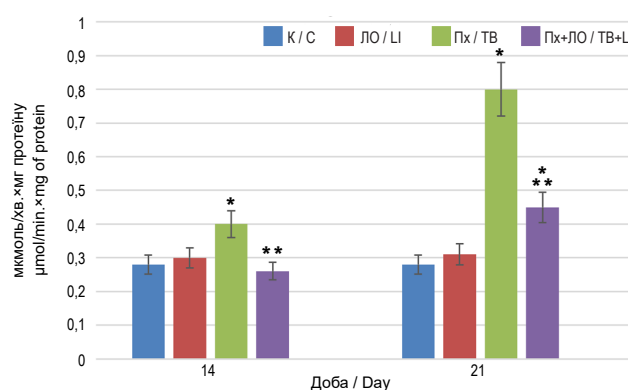


Рис. 2. Ферментативна активність О-форми ксантиноксидази у цитозольній фракції печінки щурів-пухлиноносіїв за дії лазерного опромінення

Fig. 2. The enzymatic activity of the O-form of xanthine oxidase in the liver cytosolic fraction of tumor-bearing rats under laser irradiation

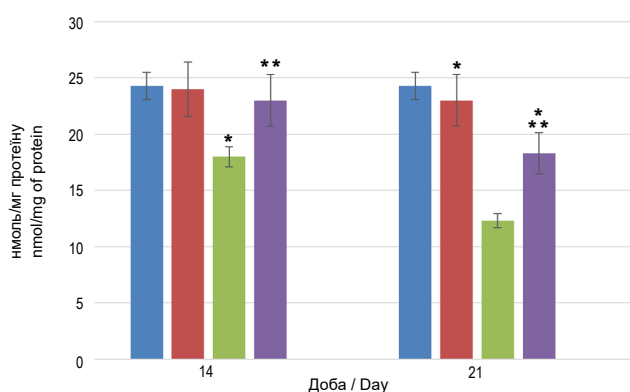


Рис. 3. Вміст білкових сульфгідрильних груп у цитозольній фракції печінки щурів-пухлиноносіїв за дії лазерного опромінення

Fig. 3. The content of protein sulfhydryl groups in the liver cytosolic fraction of tumor-bearing rats under the action of laser irradiation

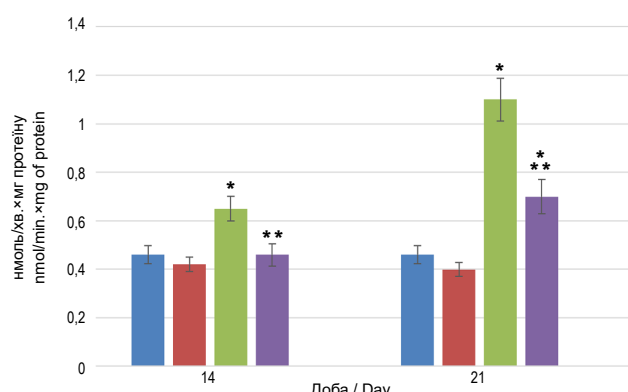


Рис. 4. Швидкість утворення супероксидного радикала в цитозольній фракції печінки щурів-пухлиноносіїв за дії лазерного опромінення

Fig. 4. The rate of superoxide radical formation in the liver cytosolic 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 ($P \leq 0.05$);

** — статистично вірогідна різниця порівняно з неопроміненими щурами-пухлиноносійми ($P \leq 0.05$).

Note: C — intact animals (control); LI — rats exposed daily to laser irradiation; TB — rats with transplanted Guerin's carcinoma; TB+LI — rats with transplanted Guerin's carcinoma exposed to laser irradiation.

* — statistically significant difference compared with control ($P \leq 0.05$);

** — statistically significant difference compared with non-irradiated tumor-bearing rats ($P \leq 0.05$).

Дія лазерного опромінення в ділянці росту карциноми Герена не призводить до змін генерації супероксидного радикала в цитозольній фракції печінки на 14-у добу росту новоутворення та підвищує швидкість його утворення на 21-у добу онкогенезу, однак показник не досягає значень, характерних для неопромінених пухлиноносіїв (рис. 4). Імовірно, протипухлинний ефект лазерного опромінення полягає у запуску апоптичної загибелі трансформованих клітин, що сприяє гальмуванню росту пухлини в організмі, що, у свою чергу, знижує її вплив на функціонування інших органів, зокрема печінки.

Висновки

За умов онкогенезу спостерігається інактивація D-форми ксантиноксидази та активація O-форми, що відбувається в результаті окисної модифікації SH-груп білка активними формами кисню. Локальне чотирихвильове лазерне опромінення щурів у ділянці локалізації пухлини знижує негативний вплив росту карциноми Герена на печінку, про що свідчать менші порушення ксантиноксидазної активності в цитозольній фракції печінки у логарифмічну та стаціонарну фази онкогенезу.

Перспективи подальших досліджень

Дослідження біохімічних механізмів впливу лазерного опромінення на пухлинну тканину та органи, не залучені у пухлинний процес, дадуть змогу широкого застосування цього виду протипухлинної терапії у медицині.

1. Bensadoun RJ. Photobiomodulation or low-level laser therapy in the management of cancer therapy-induced mucositis, dermatitis and lymphedema. *Curr. Opin. Oncol.* 2018; 30 (4): 226–232. PMID: 29794809.
2. Cilip CM, Kerr D, Latimer CA, Rosenbury SB, Giglio NC, Hutchens TC, Nau WH, Fried NM. Infrared laser sealing of porcine vascular tissues using a 1,470 nm diode laser: Preliminary *in vivo* studies. *Lasers Surg. Med.* 2017; 49 (4): 366–371. DOI: 10.1002/lsm.22609.

3. Garcia VG, Sahyon AS, Longo M, Fernandes LA, Gualberto Júnior EC, Novaes VC, Ervolino E, de Almeida JM, Theodoro LH. Effect of LLLT on autogenous bone grafts in the repair of critical size defects in the calvaria of immunosuppressed rats. *J. Craniomaxillofac. Surg.* 2014; 42 (7): 1196–1202. DOI: 10.1016/j.jcms.2014.02.008.
4. Kusano T, Ehrichtou D, Matsumura T, Chobaz V, Nasi S, Castelblanco M, So A, Lavanchy C, Acha-Orbea H, Nishino T, Okamoto K, Busso N. Targeted knock-in mice expressing the oxidase-fixed form of xanthine oxidoreductase favor tumor growth. *Nat. Commun.* 2019; 10: 4904. DOI: 10.1038/s41467-019-12565-z.
5. Lee TH, Kang TH. DNA Oxidation and excision repair pathways. *Int. J. Mol. Sci.* 2019; 20 (23): 6092. DOI: 10.3390/ijms20236092.
6. Lowry OH, Rosenbrough MJ, Farr AL, Randal RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 1951; 193 (1): 265–275. PMID: 14907713.
7. Marchenko MM, Ketsa OV. Generation of superoxide anion-radical in the liver monooxygenase system of preliminary radiation-exposed tumor-bearing rats. *Ukr. Biochem. J.* 2012; 84 (6): 101–108. Available at: <http://ua.ukrbiochemjournal.org/2016/05/heneratsiya-superoksydnoho-radykala-komponentamy-monooksyhenaznoji-systemy-pechinky-poperedno-oprominenyh-schuriv-puhlynosijiv.html> (in Ukrainian)
8. Mesquita-Ferrari RA, Alves AN, de Oliveira Cardoso V, Artilheiro PP, Bussadori SK, Rocha LA, Nunes FD, Fernandes KPS. Low-level laser irradiation modulates cell viability and creatine kinase activity in C2C12 muscle cells during the differentiation process. *Lasers Med Sci.* 2015; 30 (8): 2209–2213. DOI: 10.1007/s10103-015-1715-8.
9. Murphy ME, Kehrer JP. Oxidation state of tissue thiol groups and content of protein carbonyl groups in chickens with inherited muscular dystrophy. *Biochem. J.* 1989; 260 (2): 359–364. DOI: 10.1042/bj2600359.
10. Ruiz A, Sebah M, Wicherts DA, Castro-Benitez C, van Hillegersberg R, Paule B, Castaing D, Vibert E, Sa Cunha A, Cherqui D, Morère JF, Adam R. Long-term survival and cure model following liver resection for breast cancer metastases. *Breast Cancer Res. Treat.* 2018; 170 (1): 89–100. DOI: 10.1007/s10549-018-4714-1.
11. Schmidt HM, Kelley EE, Straub AC. The impact of xanthine oxidase (XO) on hemolytic diseases. *Redox Biol.* 2019; 21: 101072. DOI: 10.1016/j.redox.2018.101072.
12. Shelepina EP, Antonov VG, Kozhemyakin LA. Molecular mechanism of transformation of xanthine oxidase activity under the action of a substrate. *Biochemistry.* 1990; 9: 1707–1712. (in Russian)
13. Shmarakov IO, Marchenko MM. Xanthine oxydase activity in the rat liver tissue in the process oncogenesis. *Ukr Biochem. J.* 2008; 80 (6): 86–91. (in Ukrainian)
14. Stein BW, Kirk ML. Electronic structure contributions to reactivity in xanthine oxidase family enzymes. *J. Biol. Inorg. Chem.* 2015; 20 (2): 183–194. DOI: 10.1007/s00775-014-1212-8.

Effect of laser irradiation on xanthine oxidase activity and superoxide radical generation in rat liver cytosol fraction

O. V. Ketsa, N. B. Kutsak, M. M. Marchenko
o.ketsa@chnu.edu.ua

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

The effect of tumor growth in the body and laser irradiation on the enzymatic activity of xanthine oxidase, in particular its D- and O-forms, and also the rate of generation of the superoxide radical ($O_2^{\cdot-}$) and the level of protein sulfhydryl groups in the liver rat cytosolic fraction has been investigated. It has been found that in the cytosolic fraction of rats with transplanted Guerin's carcinoma decreases the enzymatic activity of the D-form of xanthine oxidase with a simultaneous increase in its O-form during the period of intensive (14 days, which corresponds to the logarithmic phase of on cogenesis) and the period of final tumor growth (21 days, which corresponds to the stationary phase of oncogenesis). The increase in the enzymatic activity of the O-form of xanthine oxidase was accompanied by an increase the rate of superoxide radical generation and a decrease in the level of protein SH-groups in the liver cytosolic fraction of tumor-bearing rats. Daily directed action of laser irradiation on the area of growth of Guerin's carcinoma leads to less destructive changes in the liver. Thus, there is an increase in the enzymatic activity of the D-form of xanthine oxidase, a decrease the rate of superoxide radical formation and an increase the content of protein SH-groups in the cytosolic fraction of the liver of experimental animals compared with non-irradiated tumor-bearing rats.

Key words: cytosolic fraction of the liver, xanthine oxidase, superoxideradical, sulfhydryl groups, Guerin's carcinoma, laser irradiation

Ketsa OV, Kutsak NB, Marchenko MM. Effect of laser radiation on xanthine oxidase activity and superoxide radical generation in rat liver cytosol fraction. *Biol. Tvarin.* 2020; 22 (2): 54–57. DOI: 10.15407/animbiol22.02.054.