



УДК 576.385.5

## **5'-НУКЛЕОТИДАЗНА Й АМФ-ДЕЗАМІАЗНА АКТИВНОСТІ ПОСТНУКЛЕАРНОЇ ФРАКЦІЇ ПЕЧІНКИ ТА СИРОВАТКИ КРОВІ ЩУРІВ ІЗ ТРАНСПЛАНТОВАНОЮ КАРЦИНОМОЮ ГЕРЕНА**

*Г. П. Копильчук, І. М. Бучковська, О. М. Волощук*

*Чернівецький національний університет імені Юрія Федьковича  
вул. Коцюбинського, 2, Чернівці 58000, Україна*

---

Вивчено динаміку рівня 5'-нуклеотидазної й АМФ-дезаміазної активності постнуклеарної фракції печінки та сироватки крові щурів у процесі росту трансплантованої карциноми Герена. Встановлено, що ріст цього злоякісного новоутворення супроводжується підвищенням рівня даних активностей у постнуклеарній фракції печінки щурів-пухлиноносіїв із досягненням його максимальних значень на термінальному етапі канцерогенезу. У сироватці крові дослідних тварин спостерігали аналогічну тенденцію динаміки рівня АМФ-дезаміазної активності. Водночас 5'-нуклеотидазна активність досягає свого максимуму на логарифмічній стадії та зазнає гальмування в період стаціонарного росту і метастазування пухлини.

**Ключові слова:** 5'-нуклеотидаза, АМФ-дезаміаза, карцинома Герена, печінка, сироватка крові, щурі.

### **ВСТУП**

Відомо, що розвиток злоякісного новоутворення є потужним стресовим чинником для організму пухлиноносія [4]. Припускають [7], що система метаболізму аденозину – це одна з гальмівних модуляторних систем, яка може обмежувати стрес-реакцію, тобто є стрес-лімітуючою. Ферменти циклу пуринових нуклеотидів, зокрема АМФ-дезаміаза (КФ 3.5.4.6), яка гідролізує АМФ до ІМФ й аміаку, та 5'-нуклеотидаза (КФ 3.1.3.5), що каталізує дефосфорилування нуклеозид-5'-фосфатів, забезпечують метаболічні перетворення аденілових нуклеотидів і контролюють рівень таких специфічних внутрішньоклітинних модуляторів, як АМФ, аденозин, інозин [3, 8].

Ферменти пуринового обміну часто використовують для оцінки функціонального стану печінки під час онкологічних захворювань [1, 14, 15, 17]. Метою нашої роботи стало вивчення 5'-нуклеотидазної та АМФ-дезаміазної активності у печінці та сироватці крові щурів-пухлиноносіїв на різних етапах росту у них карциноми Герена.

## МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Дослідження проводили на самках білих нелінійних щурів масою 100–120 г та віком 2,5–3 місяці, яких утримували на стандартному раціоні віварію. Контролем (К) слугували інтактні тварини; дослідна група (Д) – щурі з трансплантованою карциномою Герена. Роботу з тваринами проводили із дотриманням положень „Загальних етичних принципів експериментів на тваринах”, ухвалених Першим Національним конгресом з біоетики. Евтаназію здійснювали під легким ефірним наркозом із застосуванням методу цервікальної дислокації на латентній, логарифмічній і стаціонарній стадіях пухлинного росту, які збігалися з 7-ю, 14-ю та 21-ю добами, відповідно, після перещеплення карциноми.

Сироватку крові відділяли шляхом центрифугування цільної крові у пробірках „Vacutainer” при 1000 г упродовж 15 хв. Печінку подрібнювали та витримували протягом 30 хвилин у фізіологічному розчині при 2°C. Постнуклеарну фракцію гомогенату печінки отримували шляхом центрифугування в 20 мМ імідазольному буфері (рН 7,0) при 1000 г протягом 10 хв.

Визначення ферментативної активності 5'-нуклеотидази проводили за модифікованим методом [5]. За одиницю активності приймали кількість неорганічного фосфату (мкмоль), утвореного за час інкубації (2,5 год) з розрахунку на 1 мл сироватки (постнуклеарної фракції гомогенату печінки). 5'-нуклеотидазну активність розраховували як різницю між кількостями  $P_i$ , отриманими під час гідролізу АМФ та інкубації з  $\beta$ -гліцерофосфатом, враховуючи похибку через неспецифічний гідроліз АМФ лужною фосфатазою. Питому активність представляли в мкмоль  $P_i$  /хв×мг білка.

АМФ-дезаміназну активність у сироватці крові та постнуклеарній фракції гомогенату печінки визначали спектрофотометрично за описаним методом [11]. За одиницю активності приймали таку кількість ферменту, яка каталізує утворення 1 мкмоль ІМФ за хвилину за стандартних умов реакції. Концентрацію білка визначали за методом Лоурі [12].

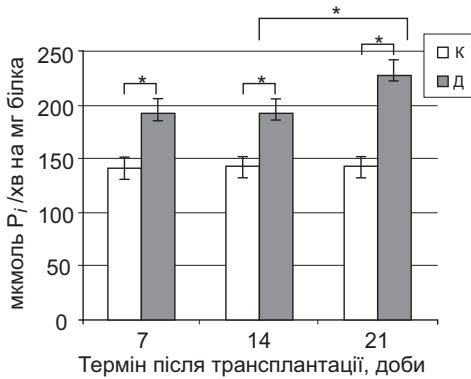
Результати досліджень опрацьовували статистично, використовуючи критерій Стьюдента.

## РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХНЄ ОБГОВОРЕННЯ

Встановлено, що в латентній стадії розвитку карциноми Герена у постнуклеарній фракції печінки щурів-пухлиноносіїв зростає рівень 5'-нуклеотидазної та АМФ-дезаміназної активності порівняно з контролем на 37% (рис. 1) і 70% (рис. 2), відповідно.

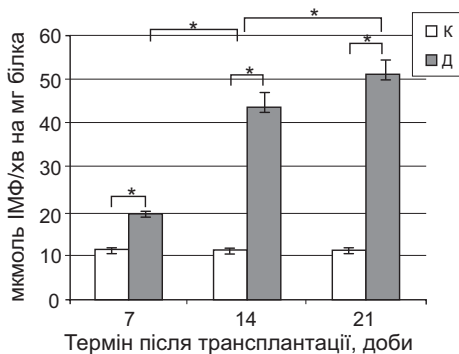
На логарифмічній стадії, в період посиленого пухлинного росту, АМФ-дезаміназна активність зростає у 2,3 разу (рис. 2) порівняно з відповідним показником латентної стадії й у 3,9 разу переважає над контрольними значеннями, тоді як нуклеотидазна активність зберігається на початковому рівні (рис. 1). Термінальний етап канцерогенезу (21-ша доба експерименту) характеризується підвищеними значеннями нуклеотидазної активності на 17% і АМФ-дезаміназної – на 18%, порівняно з показниками попереднього експериментального періоду (14-та доба).

Виявлені нами закономірності підвищення ферментативних активностей 5'-нуклеотидази й АМФ-дезамінази у постнуклеарній фракції печінки під час онкогенезу можуть відображати активацію процесів катаболізму нуклеотидів [9].



**Рис. 1.** 5'-нуклеотидазна активність у постнуклеарній фракції печінки щурів із трансплантованою карциномою Герена (\*  $p < 0,05$ )  
Тут і в подальших рисунках: К – контрольна група тварин; Д – дослідна група тварин

**Fig. 1.** 5'-nucleotidase activity of liver postnuclear fraction of rats with transplanted Guerin's carcinoma (\*  $p < 0,05$ )  
Here and on other figures: C – control group of animals; E – experimental group of animals



**Рис. 2.** АМФ-дезаміназна активність у постнуклеарній фракції печінки щурів із трансплантованою карциномою Герена (\*  $p < 0,05$ )

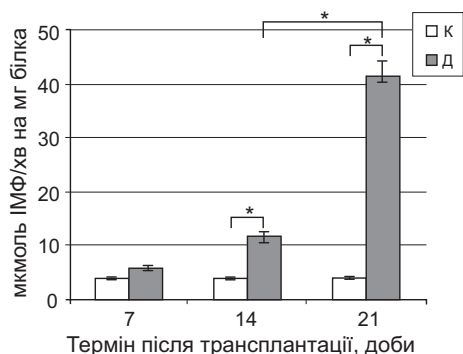
**Fig. 2.** AMP-deaminase activity of liver postnuclear fraction of rats with transplanted Guerin's carcinoma (\*  $p < 0,05$ )

5'-нуклеотидаза може включатися у два різних, але взаємопов'язаних процеси – посилене утворення аденозину [2] та залучення його до стимуляції аденілатциклази й утворення цАМФ як внутрішньоклітинного посередника у відповідь на присутність в організмі стресового чинника, яким є новоутворення [13]. Підвищення АМФ-дезаміназної активності відображає посилення процесів незворотного дезамінування АМФ до ІМФ із подальшим утворенням інозину [16], необхідного для поповнення пулу вільних нуклеотидів у печінці за умов канцерогенезу. Окрім того, інозин може активувати ферменти, задіяні в процесах клітинного дихання [8], що за умов росту злякисного новоутворення в організмі може бути проявом адаптивно-приспосувальної реакції печінки як основного гомеостатичного органа.

Дані літератури [9] засвідчують участь ферментів аденілової системи у формуванні протипухлинного імунітету. Від активності ферментів обміну пуринових нуклеотидів у крові залежить концентрація аденозину, інозину й АМФ, які можуть виконувати роль модуляторів функції імунних клітин. АМФ-дезаміназна активність сироватки крові (рис. 3) дослідних тварин характеризується відсутністю статистично вірогідних відмінностей порівняно з контрольними значеннями під час латентної стадії росту карциноми Герена. На подальших етапах експерименту показники цієї активності переважають контрольні значення у 2,8 разу в логарифмічній стадії та в 9,7 разу в стаціонарній стадії.

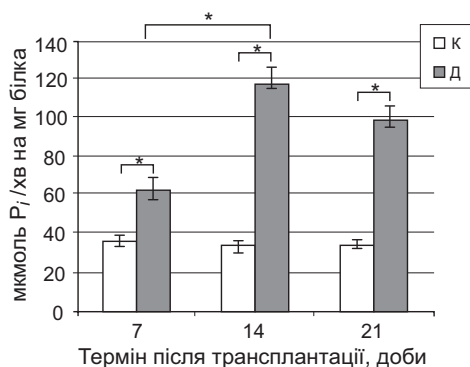
Щодо 5'-нуклеотидазної активності, то в латентній і логарифмічній стадіях, тобто в період інтенсивного росту злякисного новоутворення, у сироватці крові

щурів-пухлиноносіїв спостерігається її підвищений рівень в 1,7 та 3,5 разу відповідно, порівняно з контролем (рис. 4). На стаціонарній стадії росту карциноми Герена, що супроводжується метастазуванням, динаміка нуклеотидазної активності характеризується достовірним зниженням її значень порівняно з логарифмічною стадією, проте залишається вищою за контроль у 2,9 разу.



**Рис. 3.** АМФ-дезаміназна активність у сироватці крові щурів із трансплантованою карциномою Герена (\* $p < 0,05$ )

**Fig. 3.** AMP-deaminase activity of blood serum of rats with transplanted Guerin's carcinoma (\*  $p < 0,05$ )



**Рис. 4.** 5'-нуклеотидазна активність у сироватці крові щурів із трансплантованою карциномою Герена (\*  $p < 0,05$ )

**Fig. 4.** 5'-nucleotidase activity of blood serum of rats with transplanted Guerin's carcinoma (\*  $p < 0,05$ )

Зростання рівня нуклеотидазної активності у сироватці крові досліджуваних тварин на етапах посиленого росту новоутворення, ймовірно, відбувається у відповідь на надходження у кров низькомолекулярних фрагментів ДНК унаслідок процесів відмирання клітин шляхом апоптозу та/або некрозу [6]. 5'-нуклеотидаза існує у двох формах – цитозольній і мембранозв'язаній (екто-5'-нуклеотидаза). Екто-5'-нуклеотидаза зв'язується з плазмолемою за допомогою глікозилфосфатидилінозиту, який виконує роль так званого якоря ГФІ. Встановлене нами зростання показника нуклеотидазної активності в сироватці крові, ймовірно, відбувається саме за рахунок екто-5'-нуклеотидази, оскільки за умов пошкодження клітинних мембран порушується структура якоря ГФІ [10].

Найвираженіші зміни АМФ-дезаміназної активності виявлено на термінальних етапах росту пухлини на фоні зниження 5'-нуклеотидазної активності. Встановлений факт, ймовірно, пов'язаний зі зменшенням кількості субстрату, розщеплюваного ензимом, або з інактивацією молекули самого ензиму. Підвищення у цей період АМФ-дезаміназної активності свідчить на користь інактивації 5'-нуклеотидази.

## ВИСНОВКИ

Під час росту карциноми Герена у постнуклеарній фракції печінки пухлиноносіїв відбувається підвищення рівня 5'-нуклеотидазної та АМФ-дезаміазної активностей протягом усього експериментального періоду з максимальними їх значеннями на термінальних етапах. У сироватці крові тварин із трансплантованою карциномою Герена максимальне зростання рівня нуклеотидазної активності спостерігається на стадії активного пухлинного росту з тенденцією до гальмування такого зростання на термінальних етапах, коли має місце активація АМФ-дезаміази.

1. *Гриневич Ю.А., Югрінова Л.Г.* Пухлинні маркери, їх значимість у діагностиці та вивчені ефективності лікування онкологічних хворих. **Лабораторна діагностика**, 2008; 1(43): 3–12.
2. *Данилова В.М., Андрухова О.В., Бабійчук В.С.* та ін. Каталітичні властивості 5'-нуклеотидази у складі мембранних рафтів клітин гладеньких м'язів. **Укр. біохім. журнал**, 2003; 75 (3): 71–76.
3. *Кудіна Н.Г., Андрійчук Т.Р., Цудзевич Б.О.* Активність ферментів пуринового обміну в тимоцитах щурів за променевого ураження та введення їм рибоксину. **Укр. біохім. журнал**, 2003; 75(2): 109–112.
4. *Лю М.Б., Подобед І.С., Едыгенова А.К., Лю Б.Н.* Кислородно-перекисний механізм канцерогенеза і модифікація ДНК. **Успехи современной биологии**, 2005, 125(2): 179–188.
5. *Мансурова І.Д., Стосман Р.З.* К методике определения активности 5'-нуклеотидазы в сыворотке крови. *Лабораторное дело*, 1973; 4: 228–229.
6. *Марченко М.М., Копильчук Г.П., Шмараков І.О.* Позаклітинні фрагменти ДНК та ДНК-азна активність сироватки крові щурів із трансплантованою карциномою Герена на фоні багаторазового рентгенівського опромінення низькими дозами. **Укр. біохім. журнал**, 2004; 76(3): 131–135.
7. *Пількевич Л.І., Кононенко В.Я.* Вплив стресу на активність 5'-нуклеотидази та аденозиндезаміази в мозку і надниркових залозах щурів за умов пригнічення функції гіпоталамо-гіпофізарно-наднирковозалозної системи. **Журнал Академії медичних наук України**, 2001, 7(2): 352–358.
8. *Талбергенов С.О., Талбергенов Т.С.* Ферменты метаболизма пуриновых нуклеотидов и иммунный статус при стрессорных состояниях разного происхождения. **Успехи современного естествознания**, 2009; 7: 92–93.
9. *Талбергенов С.О., Талбергенов Т.С., Прозор І.І., Олжаева Р.Р.* Сравнительная оценка влияния радиации, гипотиреоза и ртутной интоксикации на активность ферментов обмена пуриновых нуклеотидов, антиоксидантной системы и иммунный статус. **Успехи современного естествознания**, 2009; 6: 39–43.
10. *Fujita M., Jigami Y.* Lipid remodeling of GPI-anchored proteins and its function. **Biochim. Biophys. Acta**, 2008; 1780(3): 410–420.
11. *Lushchak V.I., Storey K.B.* Effect of exercise on the properties of AMP-deaminase from trout white muscle. **Int. J. Biochem**, 1994; 26(10–11): 1305–1312.
12. *Lowri O.H., Rosenbrough N.J., Farr A.L.* Protein measurement with Folin phenol reagent. **J. Biol. Chem**, 1951; 123(1): 265–273.
13. *Pagani F., Panteghini M.* 5'-Nucleotidase in the Detection of Increased Activity of the Liver Form of Alkaline Phosphatase in Serum. **Clinical Chemistry**, 2001; 47: 2046–2048.
14. *Pragathi P.* Evaluation of serum adenosine deaminase and 5'-nucleotidase activities as probable markers in ovarian cancer. **Indian Journal of Clin. Biochemistry**, 2005; 20(2): 195–197.
15. *Sadej R., Skladanowski A.* Expression of ecto-5'-nucleotidase (eN, CD73) in cell lines from various stages of human melanoma. **Melanoma Res**, 2006; 16(3): 213–220.

16. Thebault M.T., Izem L., Leroy J.P. AMP-deaminase in elasmobranch fish: a comparative histochemical and enzymatic study. *Comp. Biochem. Physiol.*, 2005; 141: 472–479.
17. Xuerui Z., Xiuling Z. Effects of ecto-5'-nucleotidase on human breast cancer cell growth *in vitro* and *in vivo*. *Oncology Reports*, 2007; 17: 1341–1346.

### **5'-NUCLEOTIDASE AND AMP-DEAMINASE ACTIVITIES OF LIVER POSTNUCLEAR FRACTION AND BLOOD SERUM OF RATS WITH TRANSPLANTED GUERIN'S CARCINOMA**

**H. P. Kopylchuk, I. M. Buchkovska, O. M. Voloschuk**

*Chernivtsi National University named after Yuriy Fedkovych  
2, Kotsyubynskyy St., Chernivtsi 58000, Ukraine*

The dynamics of the levels of 5'-nucleotidase and AMP-deaminase activity in postnuclear fraction of rat liver and serum was studied during transplanted Guerin's carcinoma growth in rats. It was found that the malignant growth is accompanied by the increase of 5'-nucleotidase and AMP-deaminase activities tumor-bearing rat in liver postnuclear fraction, reaching their maximal levels at the terminal stage of carcinogenesis. Similar dynamics of AMP-deaminase activity was observed in blood serum of animals under study. At the same time, 5'-nucleotidase activity reached its maximal level at the logarithmic stage and decreased at the stages of stationary growth and tumor metastasis.

**Key words:** 5'-nucleotidase, AMP-deaminase, Guerin's carcinoma, liver, blood serum, rats.

### **5'-НУКЛЕОТИДАЗНАЯ И АМФ-ДЕЗАМИНАЗНАЯ АКТИВНОСТИ ПОСТНУКЛЕАРНОЙ ФРАКЦИИ ПЕЧЕНИ И СЫВОРОТКИ КРОВИ КРЫС С ТРАНСПЛАНТИРОВАННОЙ КАРЦИНОМОЙ ГЕРЕНА**

**Г. П. Копильчук, І. М. Бучковская, О. Н. Волощук**

*Черновицкий национальный университет имени Юрия Федьковича  
ул. Коцюбинского, 2, Черновцы 58000, Украина*

Изучено динамику уровня 5'-нуклеотидазной и АМФ-дезаминазной активности постнуклеарной фракции печени и сыворотки крови крыс в процессе роста трансплантированной карциномы Герена. Показано, что рост этого злокачественного новообразования сопровождается повышением уровня данных активностей постнуклеарной фракции печени крыс-опухоленосителей, достигающих его максимальных значений на терминальном этапе канцерогенеза. Аналогичная тенденция динамики уровня АМФ-дезаминазной активности наблюдается и в сыворотке крови опытных животных. В то же время показатели 5'-нуклеотидазной активности достигают своего максимума на логарифмической стадии и снижаются в период стационарного роста и метастазирования опухоли.

**Ключевые слова:** 5'-нуклеотидаза, АМФ-дезаминаза, карцинома Герена, печень, сыворотка крови, крысы.

Одержано: 06.07.2009