

УДК 577.151.643

С. О. Бабій, О. О. Дьомшина, Н. І. Штеменко

*Дніпропетровський національний університет ім. Олесь Гончара*

### **γ-ГЛУТАМИЛТРАНСФЕРАЗА В МОДЕЛІ КАНЦЕРОГЕНЕЗУ У ЩУРІВ**

Вперше визначено активність γ-глутамілтрансферази, зв'язаної із зовнішньою клітинною мембраною, та розчинну форму в цитозолі еритроцитів щурів при розвитку пухлини та корекції патологічного стану комплексними сполуками ренію (*III*) з органічними лігандами та цисплатином (система реній-платина). Встановлено підвищення активності ферменту на зовнішній мембрані клітин і зниження його розчинної ізоформи в еритроцитах при розвитку карциноми Герена Т8. Відмічено позитивний вплив застосування системи реній-платина на активність ферменту в червоних клітинах крові: підвищення активності розчинної форми та зниження мембранозв'язаної. У результаті співвідношення активності ферменту між цими двома фракціями наближалось до норми. Зроблено висновок про доцільність використання визначення активності та співвідношення мембранозв'язаної та розчинної форм γ-глутамілтрансферази еритроцитів як діагностичного показника крові при канцерогенезі.

С. А. Бабий, О. А. Демшина, Н. И. Штеменко

*Днепропетровский национальный университет им. Олесь Гончара*

### **γ-ГЛУТАМИЛТРАНСФЕРАЗА В МОДЕЛІ КАНЦЕРОГЕНЕЗУ У КРЫС**

Впервые определена активность γ-глутамилтрансферазы, связанной с внешней стороной мембраны, и растворимой формы γ-глутамилтрансферазы в цитозоле эритроцитов крыс при развитии опухоли и коррекции данного патологического состояния комплексными соединениями рения (*III*) с органическими лигандами и цисплатином (система рений-платина). Установлено повышение активности мембраносвязанной формы фермента и снижение активности его растворимой формы в эритроцитах крови при развитии карциномы Герена Т8. Также отмечено положительное влияние применения системы рений-платина на активность фермента в эритроцитах: снижение мембраносвязанной и повышение цитоплазматической активности. В результате соотношение активности фермента между двумя фракциями приближалось к нормальному уровню. Это дает возможность рекомендовать к использованию в качестве диагностического фермента крови при канцерогенезе соотношение мембраносвязанной и растворимой форм γ-глутамилтрансферазы эритроцитов.

S. O. Babij, O. O. Djomshina, N. I. Shtemenko

*Oles' Gonchar Dnipropetrovsk National University*

### **γ-GLUTAMYL TRANSFERASE IN A MODEL OF CARCINOGENESIS IN RATS**

For the first time activity of membrane bound and soluble forms of γ-glutamyl transferase in the rat erythrocytes under the model tumour *in vivo* and under correction of the pathological state by complex compounds of rhenium (*III*) with organic ligands and cisplatin (rhenium-platinum system) was studied. The increased activity of the membrane bound enzyme and decrease of its cytosolic activity in the red blood cells during development of Guerin's carcinoma T8 was found. Also the positive impact of the rhenium-platinum system on the enzymatic activity in the erythrocytes was shown, namely: the reduction of membrane bound and increase of cytosolic activity. As a result, the ratio between activity of the membrane bound

enzyme and cytosolic one verged towards the correct level. The conclusion was made that the use of membrane bound and soluble  $\gamma$ -glutamyl transferase in the erythrocytes as a diagnostic enzyme of carcinogenesis is reasonable.

## Вступ

$\gamma$ -Глутамілтрансфераза (ГГТ) – здебільшого мембранозв'язаний глікопротеїд (на частку вуглеводів припадає близько 35 % молекулярної маси білка), що регулює розклад та кон'югацію глутатіону, каталізує перенесення амінокислот через клітинну мембрану, бере участь у «глутатіоновому» циклі, а також метаболізмі ейкозаноїдів [7]. Існуюча розчинна ізоформа даного ферменту відрізняється складом вуглеводної частини. Ця розчинна ізоформа утворюється при розпаді мембранних компонентів клітини, але зберігає деякі функціональні властивості [27; 29].

Збільшення активності ГГТ віддзеркалює індукцію мікросомальної окисної системи. Фермент розташований на зовнішньому боці клітинної мембрани та всіх мембранних компонентів клітини (лізосом, мікросом тощо) [6; 21]. Здебільшого ГГТ міститься в тих клітинах, що здатні до високої секреторної, екскреторної або (ре)абсорбційної функції [6]: у клітинах епітелію проксимальних каналців нирок, гепатоцитах, еритроцитах і, меншою мірою, інших тканинах [16; 18; 28]. Визначення активності ГГТ у сироватці крові набуло великого значення для діагностики захворювань кори нирок, печінки та онкологічних захворювань [6; 13; 28], оскільки цей фермент вважають маркером оксидативного стресу [13; 28; 30].

Найчастіше як діагностичний параметр захворювань гепатобіліарного тракту визначають у сироватці крові активність розчинної ізоформи ГГТ зі зміненою вуглеводною частиною [2; 18; 27; 29]. Існують повідомлення про визначення активності ферменту в еритроцитах при різних патологіях, пов'язаних з оксидативним стресом, наприклад, онкологічні захворювання [14–18; 28–30]. При рості пухлини відмічається анемія, утворення аномальних форм еритроцитів, що пов'язано зі змінами структури мембран [5; 12; 24; 26]. При застосуванні сучасних протипухлинних препаратів, таких як цисплатин, виникає значний цитотоксичний ефект, і це в першу чергу негативно впливає на клітини крові [22].

У роботах нашої дослідницької групи зафіксовано значний мембраностабілізуювальний ефект комплексів ренію (III) з органічними лігандами (КРОЛ), залежність величини впливу комплексу на біологічні мембрани від його структури, концентрації, а також продемонстровано ефективність застосування цих комплексів у моделях гемолітичної анемії як антиоксидантів і малотоксичних препаратів [12; 17; 25–28].

Актуальна проблема – визначення ефективності медикаментозної терапії різних видів онкологічних захворювань і пошук їх маркерів [2; 4; 17]. Один із таких маркерів – можливо, активність ГГТ в еритроцитах.

Мета нашої роботи – оцінити активність мембранозв'язаної та розчинної форм ГГТ в еритроцитах щурів в умовах моделі *in vivo* при розвитку видоспецифічної карциноми Герена Т8 і при корекції канцерогенезу комплексними сполуками ренію з різними органічними лігандами.

## Матеріал і методи досліджень

Матеріал досліджень – еритроцити молодих щурів лінії Wistar вагою 100–180 г. Щурів поділено на групи: I група – норма (здорові щури); II – контроль (щури з карциномною Герена Т8); III – щури, яким вводили цисплатин; IV – щури з карциномною ГеренаТ8, яким вводили розчин  $Re_2(i-C_3H_7COO)_4Cl_2$  (діхлоротетра- $\mu$ -(ізобутирато)-диреній (III)) у комплексі з цисплатином; V – щури з карциномною Герена Т8, яким

уводили розчин  $K_2Re_2(HPO_4) \cdot 2H_2O$  (калійдіакватетра- $\mu$ -гідрофосфатодиреній (III)) у комплексі з цисплатином; VI група – щури з карциною Герена Т8, яким вводили розчин  $(NH_4)_4Re_2(HPO_4)_4 \cdot 2H_2O$  (тетраамонійдіакватетра- $\mu$ -гідрофосфатодиреній (III)) у комплексі з цисплатином.

Змішану венозно-артеріальну кров отримували шляхом декапітації тварин. Як антикоагулянт використовували гепарин (150–200 од./мл). Усі дослідження проводили в день забору крові. Для отримання еритроцитів кров центрифугували при 1500 об./хв упродовж 15 хв, потім видаляли плазму та лейкоцитарну плівку. Еритроцити тричі промивали охолодженим 0,145 М  $NaCl$  на 10 мМ Трис- $HCl$  буфері ( $pH$  7,4 при  $+25^\circ C$ ) [10].

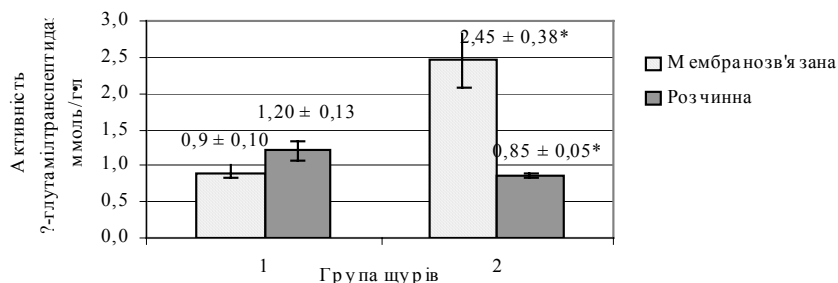
Для отримання гемолізату еритроцитів використовували гіпотонічний гемолізуючий розчин, що складався з 10 мМ Трис- $HCl$  буфера ( $pH$  7,4 при  $+25^\circ C$ ). Промиті еритроцити поміщали в охолоджену колбу з гемолізуючим розчином і витримували впродовж 10 хв при  $+5^\circ C$  у співвідношенні 1 : 4. Після цього суміш центрифугували 15 хв при 1500 об./хв [8]. Відбирали надосадову рідину для визначення активності розчинної форми ГГТ за стандартною методикою [29].

Активність мембранозв'язаної форми ГГТ визначали безпосередньо в отриманому осаді (мембранна фракція) після того, як його висушили на фільтрувальному папері [19]. До об'єму висушеного гемолізату додавали 10-кратний об'єм реакційної суміші для ГГТ (60 ммоль/л гліцин-гліцил, 0,3 моль/л  $NaCl$ , 20 ммоль/л Трис- $HCl$  буфер ( $pH$  8,0) і 2,5 ммоль/л глутаміл- $p$ -нітроаніліду). Реакція зупинялась додаванням 2 мл охолодженої 1,5 N оцтової кислоти. Після видалення осаду шляхом центрифугування концентрацію звільненого  $p$ -нітроаніліну вимірювали фотометрично при 405 нм у надосадовій рідині [16; 29].

Визначення активності ГГТ проводили за допомогою стандартного тест-набору фірми «Реагент» (м. Дніпропетровськ) [22].

### Результати та їх обговорення

Досліджено активність розчинної та мембранозв'язаної форм ГГТ в еритроцитах щурів при канцерогенезі (рис. 1).



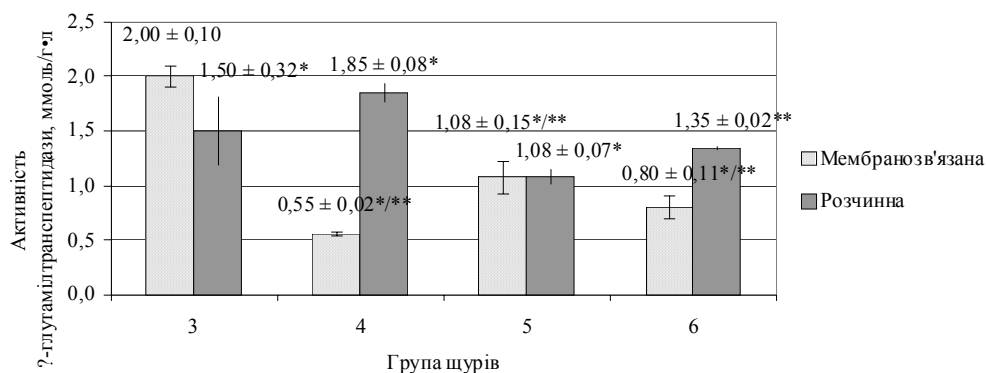
**Рис. 1. Активність  $\gamma$ -глутамілтранспептидази в еритроцитах щурів у нормі та при розвитку карциноми Герена Т8: 1 – група здорових щурів, 2 – контрольна група щурів із карциною Герена Т8; \* –  $p < 0,05$**

У нормі активність внутрішньоклітинної фракції на 33 % перевищує активність мембранозв'язаної, що можна пояснити утворенням розчинної форми у ході еритропоезу внаслідок лізису внутрішніх органел клітини [5]. Під впливом карциноми Герена Т8 активність мембранозв'язаної ГГТ зростала майже на 30 %. Виходячи з основних функцій ГГТ розвиток пухлини супроводжується посиленням протеолізом [8] і окисними процесами [9]. Можна припустити, що активність саме мембранозв'язаного фер-

менту збільшується через посилення відновних процесів у клітині внаслідок активації глутатіонової системи [15].

Аналіз розчинної фракції ферменту в цитоплазмі еритроцитів щурів показав зворотний процес: активність ГТТ знижувалась на 29 %. Таким чином, активність ГТТ на мембрані еритроцитів – чутливий показник розвитку карциноми Герена Т8. У нормі коефіцієнт активності цитозоль/мембрана становив 4 : 3, а при розвитку досліджуваної патології – майже 1 : 3. За допомогою цього співвідношення, вірогідно, можна судити про процеси, які переважають у клітині (розпад білків або їх синтез).

При уведенні цисплатину активність як розчинної, так і мембранозв'язаної форми ГТТ в еритроцитах залишалась на високому рівні відносно контрольної групи (рис. 2). Це може бути пояснено цитотоксичною дією препарату. Внутрішньоклітинна фракція ГТТ пізніше реагує на зовнішній оксидативний стрес і може бути вторинним захисним механізмом клітини у підтриманні гомеостазу.



**Рис. 2. Активність  $\gamma$ -глутамілтранспептидази в еритроцитах щурів при корекції патологічного стану комплексами ренію (III): 3–6 – групи тварин див. розділ «Матеріал і методи досліджень»; \* –  $p < 0,05$ , порівняно з контролем; \*\* –  $p < 0,05$ , порівняно з групою 3**

При корекції даного патологічного стану цисплатином разом із КРОЛ спостерігалось зниження активності мембранної ГТТ еритроцитів до рівня норми. Особливо цей ефект помітний при використанні розчинів калійдіакватетра- $\mu$ -гідрофосфатодиренію (III) і тетраамонійдіакватетра- $\mu$ -гідрофосфатодиренію (III) (див. рис. 2). Тобто активність ГТТ стала нижчою порівняно з контрольною групою на 55 і 70 % відповідно.

Можливо, ці препарати знижують токсичну дію цисплатину, що підтверджується гальмуванням активності ГТТ як одного з компонентів глутатіонової системи, за рахунок зниження оксидантів у крові та глутатіону, що є субстратом для цього ферменту [3; 20]. Також цисплатин, який вводили спільно з комплексами ренію, може вступати в реакцію з тіоловими групами клітинних пептидів та білків, що призводить до зниження концентрації глутатіону [17; 22] і активності ГТТ.

Внутрішньоклітинна активність ГТТ значно знижувалася при дослідженні впливу комплексних сполук ренію (III) у поєднанні з цис-платином, відносно групи тварин, яким вводили лише цисплатин. При використанні цисплатину та комплексів  $(NH_4)_4Re_2(HPO_4)_4 \cdot 2H_2O$ ,  $K_2Re_2(HPO_4)_4 \cdot 2H_2O$  рівень активності ферменту наближається до норми та знижується, відповідно, на 30 і 10 %, відносно групи з уведенням цисплатину. У результаті співвідношення активності ферменту між розчинною формою та мембранозв'язаною при використанні цисплатину складало приблизно 3 : 4;

$Re_2(i-C_3H_7COO)_4Cl_2$  із цисплатином – 3 : 1;  $K_2Re_2(HPO_4) \cdot 2H_2O$  із цисплатином – 1 : 1 і  $(NH_4)_4Re_2(HPO_4)_4 \cdot 2H_2O$  із цисплатином – 1 : 6, що найбільше відповідає нормі.

### Висновки

Вперше досліджено активність розчинної з гетерогенною вуглеводною частиною та мембранозв'язаної форм  $\gamma$ -глутамілтрансферази в еритроцитах щурів при розвитку пухлини та при корекції патологічного стану комплексними сполуками ренію (III) з органічними лігандами разом із цисплатином (система реній-платина). Встановлено достовірне підвищення активності мембранозв'язаної фракції ферменту при оксидативному стресі під дією канцерогенезу та ксенобіотиків. Відмічено позитивний вплив застосування системи реній-платина на активність ферменту в червоних клітинах крові: зниження мембранозв'язаної та підвищення активності розчинної форми ГГТ. У результаті співвідношення активності ферменту між цими двома фракціями наближалось до норми. Отримані дані дають змогу рекомендувати визначення активності мембранозв'язаної та розчинної форми ГГТ в еритроцитах як діагностичний параметр розвитку канцерогенезу та його корекції при лікуванні.

### Бібліографічні посилання

1. **Бреслоу Е.** Комплексы металлов с белками / Неорг. химия. – М. : Мир, 1978. – 254 с.
2. **Воллеман М.** Биохимия опухолей мозга / Под ред. М. Ш. Промыслова. – М. : Мир, 1977. – 213 с.
3. **Гончарова Л. Л.** Тиолсульфидная система в клинической практике // Лабораторное дело. – 2003. – № 2. – С. 3–9.
4. **Дурнов Л. А.** Опухоли у детей. – М. : Медицина, 1970. – 432 с.
5. **Жабицкая Е. Д.** Влияние эритроцитарных аномалий на аминокислотный состав плазмы крови / Е. Д. Жабицкая, Н. И. Штеменко, О. А. Сорочан // Вісник Дніпропетр. ун-ту. Біологія. Екологія. – 2004. – № 2. – С. 46–49.
6. **Зильва Д.** Клиническая химия в диагностике и лечении / Д. Зильва, П. Р. Пэинел. – М. : Медицина, 1988. – 527 с.
7. **Камышников В. С.** Пособие по клинико-биохимическим исследованиям и лабораторной диагностике. – М. : Медпрессинформ, 2004. – 414 с.
8. **Система** протеолиза, апоптоз и антиэндоксинный иммунитет у больных со злокачественными новообразованиями / В. А. Кубышкин, А. И. Крадинов, В. В. Опрышко и др. // Таврический медико-биологический вестник. – 2009. – Т. 12, № 4. – С. 95–103.
9. **Кулинский В. И.** Активные формы кислорода и оксидативная модификация макромолекул: польза, вред и защита // Соросовский образовательный журнал. – 1999. – № 1. – С. 2–7.
10. **Кыров Д. Н.** Исследование модулирующих эффектов гемолизата эритроцитов на активность  $Na, K$ -АТФазы // Автореф. дисс. ... канд. биол. наук. – Тюмень, 2006. – 19 с.
11. **Шалимов С. А.** Лечение неоперабельных опухолей органов брюшной полости / С. А. Шалимов, Л. В. Кейсевич, А. А. Литвиненко и др. // Здоров'я України. – 2003. – № 76. – С. 5–9.
12. **Изучение** влияния комплексов рения с органическими лигандами на кислотно-резистентность эритроцитов человека / Н. И. Штеменко, И. В. Пирожкова-Паталах, А. В. Штеменко, А. А. Голиченко // Укр. біохім. журн. – 2000. – Т. 72, № 3. – С. 77–81.
13. **Antioxidant** status in patients with sleep apnoea and impact of continuous positive airway pressure treatment / A. Barcelo, F. Barbe, M. Pen et al. // Eur. Respir. J. – 2006. – Vol. 27. – P. 756–760.
14. **Collins D.** Plasma intestinal alkaline phosphatase and intermediate molecular mass gamma-glutamyltransferase activities in the differential diagnosis of jaundice / D. Collins, M. F. Good, S. B. Rosalki et al. // J. Clin. Pathol. – 1987. – Vol. 40. – P. 1252–1255.
15. **Possible** role of membrane gamma-glutamyltransferase activity in the facilitation of transferrin-dependent and independent iron uptake by cancer cells / S. Dominici, L. Pieri, M. Comporti, A. Pompella // Caner Cell International. – Vol. 3, N 7. – С. 2–8.

16. **Characterization** of acute undifferentiated leukemia by combined analysis of plasma membrane-associated glutamyltransferase and soluble terminal transferase / D. Heumann, G. Losa, C. Banras et al. // The J. of the Am. Society of Hematology. – 1985. – Vol. 6, N 2. – P. 255–258.
17. **Kratz F. A.** Anticancer metal complexes and tumour targeting strategies / F. A. Kratz, M. T. Schutte // The Cancer J. – 1998. – Vol. 11, N 4. – P. 1–11.
18. **Long M. G.** Erythrocyte mean cellular volume and gamma-glutamyltransferase activity in screening for alcohol abuse in women presenting with spontaneous miscarriage / M. G. Long, E. J. Waterson, I. M. Murray-Lyon // J. of Obst. and Gynecol. – 1993. – Vol. 13, N 3. – P. 175–176.
19. **Patent** № 5.096.812 (Unated States Patent) Assay method for gamma glutamyltransferase (GGT) in liquid blood and drier blood // J. M. Rachel, L. M. Smith, L. R. Pfaltzgraff. – 1992, March. – 8 p.
20. **Blood** glutathione disulfide: *in vivo* factor or *in vitro* artifact? / R. Rossi, A. Milzani, I. Dalle-Donne et al. // Clin. Chem. – 2002. – Vol. 48. – P. 742–753.
21. **Sener A.** Activity determination, kinetic analyses and isoenzyme identification of gamma glutamyltransferase in human neutrophils / A. Sener, T. Yardimici // J. of Biochem. And Mol. Biol. – 2005 – Vol. 38, N 3. – P. 343–349.
22. **Sheikh-Hamad D.** Cisplatin-induced cytotoxicity: is the nucleus relevant? // Am. J. Physiol. Renal Physiol. – 2008. – Vol. 295. – P. 42–43.
23. **Shimada H.** Distribution of gamma-glutamyl transpeptidase and glutaminase isoenzymes in the rabbit single nephron / H. Shimada, E. Hitoshi and S. Fuminori // Jpn. J. Pharmacol. – 1982. – Vol. 32. – P. 121–129.
24. **Synthesis**, characterization, *in vivo* antitumor properties of the cluster rhenium compound with GABA ligands and its synergism with cisplatin / A. V. Shtemenko, P. Collery, N. I. Shtemenko et al. // Dalton Trans. – 2009. – P. 5132–5136.
25. **Liposomal** forms of rhenium cluster compounds: Enhancement of biological activity / N. I. Shtemenko, E. D. Zhabitskaya, O. V. Bersenina et al. // Chemistry & Biodiversity. – 2008. – Vol. 5. – P. 1660–1667.
26. **Shtemenko N. I.** Recent advantages in application of cluster rhenium compounds as antitumor agents / N. I. Shtemenko, P. Collery, A. V. Shtemenko // Metal Ions in Biology and Medicine. – 2008. – Vol. 10. – P. 441–445.
27. **Wenham D. R.** Multiple forms of gamma-glutamyltransferase: a clinical study // Clin. Chem. – 1985. – Vol. 31. – P. 559–572.
28. **Whitfield J.** Serum glutamyltransferase and risk of disease // Clin. Chem. – 2007. – Vol. 53. – P. 1–2.
29. **Meng** abnormal expression of hepatoma-derived gamma-glutamyltransferase subtyping and its early alteration for carcinogenesis of hepatocytes / Deng-Fu Yao, Zhi-Zhen Dong, Deng-Bing Yao et al. // Hepatobiliary & Pancreatic Diseases International. – 2004. – Vol. 3. – P. 564–570.
30. **Zhang H.** Redox regulation of glutamyl transpeptidase / H. Zhang, H. J. Forman // Am. J. of Respiratory Cell and Mol. Biol. – 2009. – Vol. 41. – P. 509–515.

Надійшла до редакції 08.07.2010