

## ФЛУОРЕСЦЕНТНІ ХАРАКТЕРИСТИКИ ПУХЛИННИХ ПРЕПАРАТІВ ЩУК *ESOX LUCIUS*, УРАЖЕНИХ ЛІМФОСАРКОМАТОЗОМ

Л.П. Бучацький<sup>1</sup>, С.В. Хижняк<sup>2</sup>, Л.В. Сорокіна<sup>2</sup>,  
О.В. Залоїло<sup>1</sup>, В.М. Войціцький<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Інститут рибного господарства УААН, м. Київ

<sup>2</sup> Київський національний університет імені Тараса Шевченка

---

Наведено дані флуоресцентних характеристик пухлинних препаратів щук *E. lucius*, які свідчать про структурні модифікації клітин, уражених лімфосаркоматозом.

---

Лімфосаркоматоз у щук *Esox lucius* вперше був описаний в Ірландії [1], потім його знаходили у щук, які мешкають у внутрішніх водоймах США, Канади, а також у Балтійському морі [2]. У континентальній Європі ця хвороба була вперше описана у щук *E. lucius*, виловлених у водосховищах дніпровського каскаду [3, 4]. Ця хвороба завдає значних збитків рибництву і разом з тим являє собою зручну модель для вивчення процесів онтогенезу.

Дотепер із пухлинних тканин риб ізольовано близько двох десятків ретровірусів, здатних викликати пухлинні процеси в експерименті. За унікальними фізико-хімічними та біологічними властивостями ці віруси були виділені в окремий рід під назвою *Epsilonretrovirus*. Серед цих найбільш детально вивчений вірус дермальної саркоми судака, в геномі якого знайдені послідовності, що кодують аналоги клітинних циклінів [5].

Ретровірус, ізольований із пухлин щук, вивчений менш детально. Вплив цього вірусу на організм щук також вивчений недостатньо.

Відомо, що в пухлинних тканинах відбуваються значні зміни в мембранах клітин [6], які в передусім пов'язані з конформаційним станом молекул білків та ліпідів. Ці зміни в мембранах можна оцінювати за величиною триптофанової флуоресценції та ефективністю її гасіння акриламідом, оскільки флуоресценція

триптофанів залежить від їх розташування в білковій молекулі та ліпідного оточення [7, 8].

У зв'язку з цим метою роботи було дослідження структурно-динамічних властивостей препаратів, отриманих із пухлинних тканин щук *E. lucius*, уражених лімфосаркоматозом.

### МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

Щук, уражених лімфосаркоматозом, а також здорових, відловлювали у Київському водосховищі. Діагноз ставили за допомогою загальноприйнятих гістологічних досліджень, у деяких експериментах верифікацію проводили за допомогою ланцюгової полімеразної реакції [9].

Зразки пухлинних тканин відбирали у щук з явними ознаками лімфосаркоматозу (Д-дослід). Контролем (К) слугували нормальні тканини щук, розташовані в аналогічній ділянці тіла. Зразки промивали у фізіологічному розчині і гомогенізували у 0,5 М фосфатному буфері протягом 3 хв при 2000 об./хв з подальшим центрифугуванням при 3000 г протягом 20 хв. Отриманий супернатант фільтрували та використовували в дослідях. Білок визначали за методом Лоурі [10].

Конформаційний стан білкової молекули оцінювали за величиною триптофанової флуоресценції та ефективністю її гасіння акриламідом. Для цього суспензію препаратів (0,1 мг/мл в об'ємі 2 мл)

титрували 1 М розчином акриламідю до кінцевої концентрації 0,4 М [11]. Для розрахунку параметрів гасіння власної білкової флуоресценції використовували модифіковане рівняння Штерна-Фольмера, яке враховує гетерогенність флуорофорних груп: тобто наявність тих, флуоресценція яких повністю гаситься і тих, які не піддаються гасінню:

$$\frac{F_0}{F_0 - F} = \frac{1}{\beta K_{sv} [Q]} + \frac{1}{\beta},$$

де  $F_0$  і  $F$  — інтенсивність флуоресценції за відсутності та наявності гасника,  $Q$  — концентрація гасника,  $K_{sv}$  — константа гасіння Штерна-Фольмера,  $\beta$ -частка триптофанових залишків, які піддаються гасінню за цих умов.

Інтенсивність флуоресценції триптофанових залишків реєстрували при 340 нм за довжини хвилі збудження 295 нм. Середовище інкубації містило 20 мМ фосфатний буфер (рН 7,4 за 25°C) [7, 8].

Дослідження мікрів'язкості ліпідної компоненти проводили з використанням флуоресцентного зонду пірену, гідрофобні молекули якого локалізуються в зоні жирнокислотних ланцюгів фосфоліпідів [12, 13].

Вбудовування пірену та визначення ступеня його ексимеризації здійснювали за методами [14, 15]. До суспензії препаратів (0,1 мг/мл) в об'ємі 2 мл буферу, який містив 0,1 М КС1, 25 мМ НЕРЕС-Тріс (рН 7 за 25°C) при безперервному перемішуванні порціями додавали 1 мМ спиртовий розчин пірену до кінцевої концентрації 5 мкМ. Через 15 хв інкубації за 25°C реєстрували спектри флуоресценції.

Для незалежного визначення мікрів'язкості анулярних (приблизкових) ліпідів та загальної ліпідної фази, збудження флуоресценції зонду проводили шляхом індуктивно-резонансного переносу енергії (ІРПЕ) з триптофанових залишків мембранних білків за  $\lambda_{36} = 280$  нм (в'язкість анулярних ліпідів), а потім у тих самих зразках у результаті збудження пірену за  $\lambda_{36} = 335$  нм (в'язкість загальної ліпідної фази).

Мікрів'язкість оцінювали за величиною, оберненою ступеня ексимеризації пірену, яку визначали як:

$$N = (F_e/F_m),$$

де  $N$  — ступінь ексимеризації пірену,  $F_e$  — інтенсивність флуоресценції ексимерів пірену при довжині хвилі 470 нм, а  $F_m$  — інтенсивність флуоресценції мономерів пірену за 390 нм. У дослідженнях оцінювали відносні зміни ступеня ексимеризації пірену в дослідних зразках порівняно з контролем.

Ефективність індуктивно-резонансного переносу енергії (ІРПЕ) оцінювали в донорно-акцепторній парі (триптофан-пірен) [16, 17]. Флуоресцентні вимірювання здійснювали за  $\lambda_{36} = 280$  нм та  $\lambda_{фл} = 340$  нм [18]. Концентрація білка при цьому становила 0,1 мг/мл. Титрували (гасили флуоресценцію) зондом до кінцевої концентрації 5 мкМ. Всі вимірювання проводили на спектрофлуориметрі Shimadzu-RF510 (Японія) у кварцових односантиметрових кюветах за 25°C.

Експериментальні дані обробляли згідно з загальноприйнятими методами статистики [10]. Розраховували значення середньоарифметичних величин ( $M$ ) та похибок середніх величин ( $m$ ). Для визначення вірогідних відмінностей між середніми величинами використовували критерій Ст'юдента.

## РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Встановлено, що у препаратах, отриманих із хворих щук, інтенсивність флуоресценції триптофанових залишків білкових молекул знижується в середньому на 11% відносно контрольних значень (табл. 1). Виявлені зміни можуть бути пов'язані як з конформаційними перебудовами білкової молекули, які супроводжуються переходом триптофанових залишків у більш гідрофільну ділянку, так і з внутрішньомолекулярною динамікою білків та характером взаємодії їх триптофанових залишків з сусідніми групами, оскільки флуоресценція триптофанів чутлива до рухомості сусідніх груп тощо. Відомо, що власну флуоресценцію білків, при збудженні в ультрафіолетовій ділянці спектра, зумовлює наявність триптофанових, тирозинових та фенілаланінових залишків. Однак домінуючий внесок в інтенсивність флуоресценції за  $\lambda_{36} = 340$  нм здійснюють саме триптофанові залишки білків [7, 8].

Таблиця 1. Параметри гасіння акриламідом триптофанової флуоресценції пухлинних препаратів щуки ( $M \pm m$ )

Показник	Контроль	Дослід
Інтенсивність триптофанової флуоресценції за відсутності гасника, $F_0$ (відн. од.)	1,00±0,05	0,89±0,10
Константа Штейна-Фольмера $K_{sv}$ ( $M^{-1}$ )	1,46±0,23	5,69±0,43*
Кількість триптофанових залишків, доступних гасінню, $\beta$ (відн. од.)	0,57±0,11	0,92±0,14*

\*  $P < 0,05$  відносно контролю.

Для оцінки конформаційних змін мембранних білків вивчали гасіння триптофанової флуоресценції зовнішнім нейтральним полярним гасником — акриламідом.

На рис. 1 наведено дані щодо гасіння триптофанової флуоресценції препаратів у модифікованих координатах Штерна-Фольмера. Результати свідчать, що в контролі 57% триптофанових залишків доступні для гасіння. В умовах досліду частка триптофанових залишків які піддаються гасінню, зростає і становить 92%. За кутном нахилу прямих (див. рис. 1) визначали ефективну константу гасіння ( $K_{sv}$ ), зміни якої відображають внутрішньо-молекулярну динаміку білкових

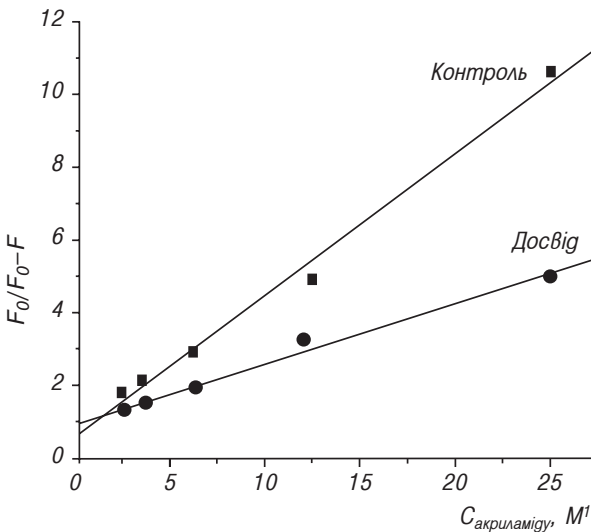


Рис. 1. Модифікований графік Штерна-Фольмера для гасіння акриламідом триптофанових залишків пухлинних препаратів щуки (типів залежності)

молекул [7]. Встановлено, що величина ефективної константи гасіння зростає приблизно у 3,8 раза (див. табл. 1).

З позицій дифузійного механізму, той факт, що акриламід гасить флуоресценцію триптофанілів, свідчить про можливість дифузії гасника всередину білкових глобул чи/або флуктуацію білкової матриці, яка забезпечує проникнення акриламіду [8]. Тому, зростання ефективності гасіння триптофанової флуоресценції (див. табл. 1), може бути зумовлене зменшенням структурної жорсткості білкових молекул. У свою чергу, це може спричиняти зростання частки триптофанових залишків, що піддаються гасінню.

Дослідження мікрров'язкості ліпідної компоненти пухлинних препаратів уражених щук проводили з використанням флуоресцентного зонду пірену. Поглинаючи квант світла, молекула пірену переходить у збуджений стан. У такому стані вона або випромінює в ділянці 390 нм, або при зіткненні з іншою незбудженою молекулою утворює пару — ексимер, який випромінює квант світла в ділянці 480 нм. За заданої температури та концентрації зонду ступінь ексимеризації пірену значною мірою залежить від мікрров'язкості його оточення і може слугувати її характеристикою.

На основі результатів досліджень встановлено, що у контролі величини, які характеризують ступінь ексимеризації пірену  $N_{280}$  та  $N_{335}$ , відрізняються (табл. 2). Тобто існують відмінності у мікрров'язкості ліпідів різних ліпідних фаз. В умо-

Таблиця 2. Ступінь ексимеризації пірену та ефективність індуктивно-резонансного переносу енергії в парі флуорофорів триптофан–пірен ( $F_0-F/F_0$ , відн. од.) ( $M \pm m$ )

Показник	Контроль	Дослід
N335	0,632±0,021	0,491±0,020
N280	1,164±0,034	0,449±0,019*
$F_0-F/F_0$	0,119±0,011	0,364±0,018*

\* $P < 0,05$  відносно контролю.

вах досліді ступінь ексимеризації для анулярних ліпідів ( $N_{280}$ ) знижується, що свідчить про зростання мікрров'язкості ліпідної фази. Крім того, не спостерігається істотної різниці величин  $N_{335}$  та  $N_{280}$  для дослідних препаратів, що говорить про однорідність властивостей різних ліпідних пулів. В'язкість ліпідів, як відомо, є інтегральною величиною і залежить від складу фосfolіпідів, умісту холестеролу, який впорядковує структуру мембрани, кількості ненасичених жирних кислот, ступеня їх ненасиченості та від інтенсивності перебігу процесів перекисного окиснення ліпідів у мембранах тощо [19]. Таким чином, отримані дані вказують на зміни структурної впорядкованості ліпідної компоненти в препаратах, отриманих із уражених лімфосаркоматозом щук.

За допомогою методу індуктивно-резонансного переносу енергії (ІРПЕ) в парі флуорофорів донор — акцептор можна оцінити просторову організацію біологічних комплексів у досліджуваних препаратах. Ефективність ІРПЕ з донора на акцептор значною мірою залежить від взаємного розташування ділянок переважної локалізації флуорофорів у мембрані [13], що дає можливість оцінити зміни відстані між цими ділянками. Як донорно-акцепторні пари використовували триптофан–пірен. Результати дослідів, у яких вивчали гасіння триптофанової флуоресценції піреном, свідчать про відмінність спектрів флуоресценції для контрольних та дослідних препаратів (рис. 2).

За результатами гасіння флуоресценції донора акцептором розраховували частку залишків донора, доступних гасінню акцептором, та величину  $F_0-F/F_0$ , (де  $F_0$  — інтенсивність флуоресценції за відсутності гасника;  $F$

— за наявності гасника), яка свідчить про ефективність ІРПЕ.

Для пари флуорофорів триптофан–пірен відзначено достовірне зростання величини  $F_0-F/F_0$  (табл. 3). Результати цих експериментів свідчать про зростання ефективності переносу енергії в парі триптофан–пірен. Як відомо, за ефективністю гасіння піреном триптофанової флуоресценції можна оцінити ступінь занурення білків у ліпідну фазу мембран. З таких позицій можна говорити про зростання занурення білків у ліпідний бішар [18]. Слід враховувати, що на ефективність ІРПЕ можуть впливати конформаційні зміни білкових молекул. Дані, наведені вище, свідчать про конформаційні зміни білкових молекул пухлини щук, уражених лімфосаркоматозом.

У нашій попередній роботі [20] було встановлено, що в пухлинній тканині щук, хворих на лімфосаркоматоз, відбу-

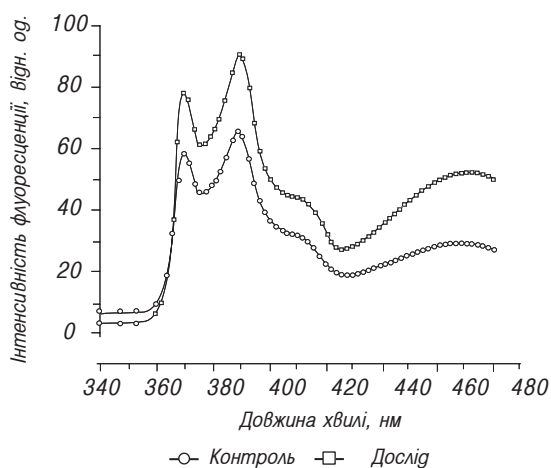


Рис. 2. Спектри флуоресценції триптофанових залишків контрольних та дослідних препаратів щук за наявності пірену (5 мкМ),  $\lambda_{36} = 280$  нм. Абсциса —  $\lambda_{фл}$ , нм (типів залежності)

ваються значні зрушення обміну ліпідів. Зокрема, надзвичайно зростає рівень фосфоліпідів, холестерину, вільних жирних кислот і тригліцеридів.

### ВИСНОВКИ

Отримані результати свідчать про структурні модифікації дослідних пре-

паратів риб щодо контролю, а саме: відбуваються конформаційні зміни білкових молекул та зменшується їх внутрішньо-молекулярна жорсткість разом із зміною динамічних властивостей (переміщення білкових молекул), а також модифікації структурної впорядкованості ліпідної компоненти.

### ЛІТЕРАТУРА

1. *Mulcahy M.F.* Lymphosarcoma in the pike *Esox lucius* L in Ireland // Proc. Roy. Irish Acad. Sect. B. — 1963. — 63. — P. 103–129.
2. *Papas T.S., Dahlberg J.E., Sonstegard R.A.* Type C virus in lymphosarcoma in northern pike (*Esox lucius*) // Nature. — 1976. — Vol. 261. — P. 507–508.
3. *Бучацький Л.П.* Лімфосаркома щук Київського водосховища // Ветеринарна медицина України. — 2000. — № 11. — С. 14–15.
4. *Бучацький Л.П., Вовк Н.І., Галахін К.О.* Гістологічна структура пухлин при лімфосаркоматозі щуки та карциномі яща // Рибне господарство. — 2003. — С. 121–124.
5. *LaPierre L.A., Casey J.W., Holzschu D.L.* Walleye retrovirus associated with skin tumors and hyperplasias encode cyclin D homologs // J. of Virology. — 1998. — Vol. 72, № 11. — P. 8765–8771.
6. *Чехун В.М.* Зміна мембран в процесі розвитку пухлин: Автореф. докт. дис. — К., 1994. — 24 с.
7. *Демченко А.П.* Люминесценция и динамика структуры белков. — К.: Наук. думка, 1988. — 280 с.
8. *Лактович Дж.* Основы флуоресцентной спектроскопии. — М.: Мир, 1986. — 236 с.
9. *Бучацький Л.П., Вудмаска М.І., Найдьонов В.Г., Ногарев О.В., Залоїло О.В.* Застосування полімеразної ланцюгової реакції для діагностики лімфосаркоматозу щук Київського та Канівського водосховищ // Рибогосподарська наука України. — 2007. — № 1. — С. 60–64.
10. *Кучеренко М.Є., Бабенюк Ю.Д., Войціцький В.М.* Сучасні методи біохімічних досліджень. — К.: Фітосоціоцентр, 2001. — 424 с.
11. *Хижняк С.В., Ващенко І.В., Бублик А.А., Кисіль О.О., Войціцький В.М.* Вплив сублетальних доз іонізуючої радіації на структурно-динамічні властивості білкових молекул апікальної мембрани еритроцитів // Вісник Київського національного університету імені Тараса Шевченка. Сер. Біологія. — 1999. — Вип. 29. — С. 21–23.
12. *Владимиров Ю.А., Добрецов Г.Е.* Флуоресцентные зонды в исследовании биологических мембран. — М.: Наука, 1980. — 320 с.
13. *Добрецов Г.Е.* Флуоресцентные зонды в исследовании клеток, мембран и липопротеидов. — М.: Наука, 1989. — 277 с.
14. *Литвинов И.С., Образцов В.В.* Изучение вязкости свободных и связанных с белком липидов в мембранах // Биофизика. — 1982. — Т. XXVII, № 1. — С. 81–86.
15. *Прищеп С.Г., Герасимович Н.В., Буланова К.Я., Милютин А.А.* Влияние ионизирующего излучения в малых дозах на физико-химические характеристики мембран лимфоцитов периферической крови крыс // Радиационная биология. Радиоэкология. — 2000. — Т. 40, № 2. — С. 154–159.
16. *Фоменко Б.С., Длимбетова Г.К., Акоев И.Г.* Индуктивно-резонансный перенос энергии между хромофорами, локализованными в разных участках облученных и необлученных теней эритроцитов // Радиобиология. — 1985. — Т. XXV, № 1. — С. 12–15.
17. *Хижняк С.В., Степанова Л.І., Ромась І.І., Бублик А.А., Войціцький В.М.* Використання флуоресцентних зондів для оцінки розмірів апікальної мембрани еритроцитів після дії іонізуючої радіації // Укр. радіол. журнал. — 1998. — Т. 6, № 2. — С. 209–211.
18. *Шустанова Т.А., Милютин Н.П., Бондаренко Т.И.* Влияние дельта-сониндуцирующего пептида на структурное состояние и поверхностный заряд мембран эритроцитов крыс в норме и при холодном стрессе в опытах *in vivo* и *in vitro* // Биологические мембраны. — 2001. — Т. 18, № 5. — С. 375–381.
19. *Рыскулова С.Т.* Радиационная биология плазматических мембран. — М.: Энергоатомиздат, 1986. — 128 с.
20. *Весельський В.П., Арсан В.О., Павленко О.М., Ногарев О.В., Бучацький Л.П.* Біохімічні зміни в організмі щук, вражених лімфосаркоматозом // Рибне господарство. — 2003. — С. 131–133.

## **ФЛУОРЕСЦЕНТНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ ОПУХОЛЕВЫХ ПРЕПАРАТОВ ЩУК *ESOX LUCIUS*, ПОРАЖЕННЫХ ЛИМФОСАРКОМАТОЗОМ**

*Л.П. Бучацкий, С.В. Хижняк, Л.В. Сорокина, О.В. Залоило, В.М. Войццкий*

Приведены данные флуоресцентных характеристик опухолевых тканей щук, пораженных лимфосаркомозом. Установлены структурные модификации опухолевых тканей, в частности конформационные изменения белков и липидов.

## **FLUORESCENT CHARACTERISTICS OF PIKES LIMPHOSARCOMATOSIS TISSUES, INFECTED BY LIMPHOSARCOMATOSIS**

*L. Buchatsky, S. Khizniak, L. Sorokina, O. Zaloilo, V. Voitsitsky*

Fluorescent characteristics of pikes limphosarcomatosis tissues were studied. It was found structural modifications of infected tissues, especially conformal changes of protein molecules and lipids.

## **ОГОЛОШЕННЯ**

### **ВИЙШЛИ З ДРУКУ ПІДРУЧНИКИ:**

**І.І. Грициняк.** Науково-практичні основи раціональної годівлі риб. — К.: “Рибка моя”, 2007. — 306 с.

У книзі висвітлено особливості будови травної системи різних видів прісноводних риб, їхнє живлення, перетравлення поживних речовин корму, хімічний склад кормів, їхня поживність, способи нормування і балансування раціонів для ефективного їх використання в годівлі риб.

Значне місце відведено висвітленню науково-практичних основ використання нетрадиційних кормів у годівлі риб.

Розрахована на спеціалістів, науковців, студентів.

**Грициняк І.І., Гринжевський М.В., Третяк О.М., Ківа М.С., Мрук А.І.** Фермерське рибництво. — К.: Герб, 2008. — 560 с.

Розглядаються проблеми організації фермерських господарств, їх розміри, напрями спеціалізації, виробнича структура, технології вирощування і годівлі риби, економічна ефективність виробництва.

Розрахована на спеціалістів рибного господарства, науковців, студентів навчальних закладів, фермерів.

*Книги можна придбати у відділу міжнародного науково-технічного співробітництва та інтелектуальної власності Інституту рибного господарства УААН чи замовити поштою.*