

УДК 577.2.043:539.1

Ю. В. Саенко, А. М. Шутков, С. М. Напалкова,
Е. В. Расторгуева, А. Г. Маслакова, Д. В. Серова

РАДИАЦИОННОЕ ИЗЛУЧЕНИЕ ИНДУЦИРУЕТ ОТСРОЧЕННЫЙ, МИТОХОНДРИАЛЬНО-ЗАВИСИМЫЙ ОКСИДАТИВНЫЙ СТРЕСС В КЛЕТКАХ ЛЕЙКЕМИИ K562¹

Аннотация. Исследованы динамика развития и источники радиационно-индуцированного оксидативного стресса с использованием культуры клеток лейкемии K562. Внутриклеточная концентрация активных форм кислорода (АФК) без и в присутствии ротенона и митохондриальный потенциал анализировались через 15, 30 мин, 1, 4, 8, 12, 24, 48 ч после облучения рентгеновским излучением в дозе 4 и 12 Гр. Радиационно-индуцированная генерация АФК в клетках K562 имеет два временных максимума, первый максимум зафиксирован через 30 мин, второй – через 24 ч после облучения. Добавление ротенона к клеткам через 24 и 48 ч после облучения уменьшало уровень АФК. Увеличение концентрации АФК сопровождается ростом митохондриального потенциала. Митохондрии являются причиной роста концентрации АФК в период 12–48 ч после облучения.

Ключевые слова: оксидативный стресс, митохондриальный потенциал, рентгеновское излучение, активные формы кислорода.

Abstract. The authors have studied the development dynamics and sources of radiation-induced accumulation of reactive oxygen species and the role of mitochondria in this process using cell cultures of leukemia K562. Intracellular concentration of reactive oxygen species (ROS), in presence or without the rotenone and the mitochondrial potential were analyzed after 15, 30 minutes, 1, 4, 8, 12, 24, 48 hours after irradiation by X-rays at the doses of 4 and 12 Gy. Radiation-induced generation of ROS in K562 cells has two maximum in time, the first peak recorded after 30 minutes and the second - 24 hours after exposure. Adding rotenone to cells at 24 and 48 hours after irradiation reduced the level of ROS. Increased concentrations of ROS accompanied by increased mitochondrial potential. Mitochondria are responsible for the growth of the concentration of ROS in the period 12-48 h after irradiation.

Key words: oxidative stress, mitochondrial potential, X-ray radiation, reactive oxygen species.

Введение

Ионизирующее излучение оказывает многостороннее повреждающее воздействие на живые организмы. По мнению многих исследователей, в основе повреждающего воздействия на клеточном уровне лежит образование активных форм кислорода (АФК) и индукция оксидативного стресса [1]. АФК возникают в результате радиоллиза воды и являются продуктом непосредственного взаимодействия фотонов высокой энергии с водой. К АФК относят короткоживущие радикалы – гидроксильный радикал и супероксид анион радикал, а также перекись водорода. Из трех представителей АФК

¹ Работа выполнена при поддержке федеральной целевой программы «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России», контракт № 16.740.11.0434 и № 14.740.11.1037.

только гидроксильный радикал является непосредственным продуктом радиолиза воды [2]. Супероксид анион радикал и перекись водорода называют вторичными АФК. Они генерируются в результате протекания цепных радикальных реакций, инициируемых гидроксильным радикалом. Теоретические расчеты продемонстрировали, что количество вторичных радикалов, возникающих после радиационного воздействия, соответствует количеству АФК, генерируемых в процессе нормального метаболизма клетки. Вторичные АФК могут генерироваться в результате ряда внутриклеточных процессов, среди которых процессы дыхания, NADPH оксидаза, ксантинооксидаза и ряд других процессов [3]. Основными поставщиками супероксид анион радикала и перекиси водорода являются митохондрии. При нормальных условиях от 1 до 4 % кислорода, поглощаемого клеткой, превращается при участии дыхательной цепи в АФК [4]. Активные формы кислорода, генерируемые в процессе патологического клеточного метаболизма, могут выступать в качестве повреждающих агентов и инициировать клеточное повреждение и смерть [4, 5]. Ионизирующее излучение может также вызывать повреждения биологических молекул путем разрыва химических связей. ДНК наиболее чувствительна к воздействию ионизирующего излучения, что проявляется образованием разрывов цепей ДНК, которые происходят в результате гидролитического разрыва фосфодиэфирной связи после переноса свободного радикала с основания на рибозный остаток [6]. Процессы свободнорадикального повреждения ДНК служат причиной мутаций и возникновения генетической нестабильности, приводящим к формированию радиорезистентных клеточных клонов [7]. Митохондриальная ДНК является менее защищенной от стрессовых воздействий по сравнению с ядерной ДНК [8]. Радиация может оказывать существенное влияние на митохондрии, что проявляется нарушением проницаемости митохондриальных мембран, нарушением синтеза АТФ, проникновением Ca^{2+} в митохондриальный матрикс и снижением митохондриального потенциала [9]. Таким образом, поврежденные митохондрии могут стать причиной увеличения внутриклеточной концентрации АФК и вызвать отсроченное во времени повреждение ДНК и возникновение генетической нестабильности и радиационно устойчивых клонов раковых клеток.

В настоящей работе нами предпринята попытка изучить динамику и причины возникновения и развития радиационно-индуцированного оксидативного стресса в раковых клетках и оценить роль митохондрий в этом процессе.

Методика исследования

В экспериментах использовали клеточную линию миелогенной лейкемии человека K562. Клетки культивировали при 37 °С во влажной атмосфере содержащей 5 % CO_2 . Для культивирования использовали среду RPMI-1649, содержащую L-глутамин, 15 % фетальной коровьей сыворотки и 0,04 % гентамицина. Клетки облучали рентгеновским излучением, генерируемым терапевтическим акселератором Clinac 600 при комнатной температуре в дозах 4 и 12 Гр однократно. Мощность дозы составляла 0,03 Гр/с при фокусном расстоянии 104 см поле облучения 30 см. Высота водяного столба над клетками составляла 1 см. Клетки облучались в 24 луночных планшетах (объем лунки 2,5 мл). Параметры оксидативного стресса и повреждения ДНК анализировались через 15, 30 мин, 1, 4, 8, 12, 24, 48 ч.

Внутриклеточную концентрацию активных форм кислорода определяли с использованием 2',7'-дихлородигидрофлуоресцеин диацетата (DCFH-DA) [10]. DCFH-DA добавляли в среду с клетками в конечной концентрации 30 мкМ за 30 мин до анализа и держали в CO₂-инкубаторе при 37 °С в темноте. Интенсивность флуоресценции дихлородигидрофлуоресцеина измеряли с использованием проточного цитометра Becton Dickinson FACS Canto (лазер 488 нм, LP зеркало – 503, BP фильтр – 530/30). Для исследования роли митохондрий в процессах генерации АФК мы использовали ротенон, который является ингибитором комплекса I дыхательной цепи [11]. Ротенон добавляли в среду за 20 мин до начала определения АФК в конечной концентрации 1 мкМ.

Митохондриальный потенциал определяли с использованием флуоресцентного красителя этилового эфира тетрародоминперхлората (TMRE) [12]. TMRE добавляли в среду с клетками в конечной концентрации 200 мкМ за 20 мин до анализа и держали в CO₂-инкубаторе при 37 °С. После инкубации среду удаляли, добавляли равный объем фосфатного буферного раствора pH 7,4 и определяли интенсивность красной флуоресценции с использованием проточного цитометра Becton Dickinson FACS Canto (лазер 488 нм, LP зеркало – 556, BP фильтр – 585/42).

Все эксперименты и определения параметров были выполнены как минимум с трехкратных повторением. Результаты выражались как среднее значение $\pm$ стандартное отклонение ($M \pm SD$). Результаты обработаны статистически с использованием критерия *t* Стьюдента для парных переменных. Различия между группами считали достоверными при $p < 0,05$.

Результаты исследования

Динамика изменения внутриклеточной концентрации АФК в клетках K562 после облучения в дозах 4 и 12 Гр представлена на рис. 1. Как видно, концентрация АФК имеет два максимума. Первый максимум наблюдается через 30 мин после облучения и превосходит концентрацию АФК контрольных клеток в 1,35 и 1,67 раза при облучении клеток дозами 4 и 12 Гр соответственно. При определении концентрации АФК через 4 ч после облучения оказалось, что она практически не отличается от таковой в контрольных клетках. Через 24 ч после облучения мы наблюдали второй максимум внутриклеточной концентрации АФК. При облучении клеток дозой в 4 Гр концентрация АФК в 1,83 раза превосходила аналогичный параметр в культуре клеток, не подвергавшихся облучению, и в 2,16 раза, если клетки подвергались облучению в дозе 12 Гр. Далее, через 48 ч после облучения происходило некоторое снижение внутриклеточной концентрации АФК.

Для оценки вклада митохондрий в генерацию АФК после облучения мы использовали ротенон, который является ингибитором комплекса I дыхательной цепи [11]. На рис. 2 представлены данные, отражающие влияние ротенона на концентрацию АФК. Как видно из графика, ротенон не влиял на концентрацию АФК, если он добавлялся через 30 мин после облучения. Ротенон снижал концентрацию АФК, если его добавляли к клеточной культуре через 24 и 48 ч после облучения (рис. 2). В точке 24 ч после добавления ротенона концентрация АФК в клетках, облучавшихся дозами 4 и 12 Гр, была всего лишь в 1,14 и 1,18 раза выше, чем в контрольной группе, тогда как без добавления ротенона она была соответственно в 1,52 и 1,61 раза выше, чем в кон-

троле. В группе 4 Гр при добавлении ротенона она статистически достоверно не отличалась от таковой в контрольной группе (рис. 2). При проведении аналогичного эксперимента по прошествии 48 ч после облучения нами наблюдалась схожая картина.

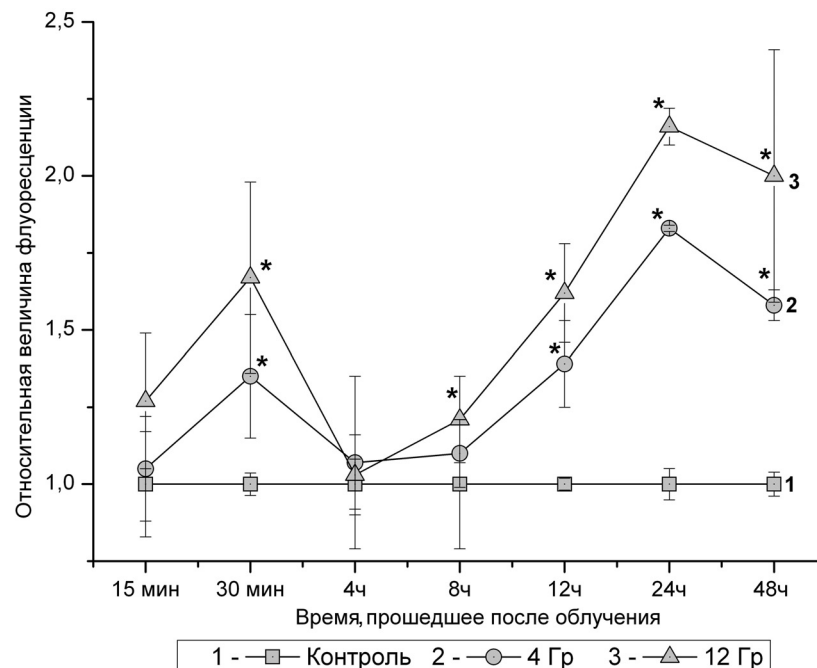


Рис. 1. Динамика изменения активных форм кислорода после облучения клеток линии K562 рентгеновским излучением в дозах 4 и 12 Гр. Данные представлены как отношение величины флуоресценции DCFH-DA в клетках, подвергшихся рентгеновскому облучению к контрольной группе; * — $p < 0,05$ в сравнении с контрольной группой

Обсуждение результатов

Радиационно-стимулированная генерация активных форм кислорода является давно известным фактом. Считается, что АФК служат основной причиной повреждающего действия радиации [1]. Также хорошо известно, что радиоактивное облучения может вызывать отдаленные последствия, связанные с возникновением нестабильности генома [7]. Генетически нестабильные линии клеток служат причиной злокачественной трансформации нормальных клеток и возникновения радиационно-устойчивых клонов раковых клеток [7]. В ряде работ продемонстрировано, что генетически нестабильные клетки характеризуются повышенной продукцией АФК, источниками которых могут являться митохондрии [8]. Однако до сих пор неизвестно, что является первоначальным событием: возникновение генетической нестабильности, а затем увеличение генерации митохондриями АФК, или митохондриально генерируемые АФК служат причиной генетической нестабильности [13]. В этой связи необходимо выяснить кинетику и источники радиационно-индуцируемых АФК на протяжении достаточного промежутка времени для возникновения признаков генетической нестабильности. Из резуль-

татов экспериментов видно, что внутриклеточная концентрация АФК после однократного облучения дозами 4 и 12 Гр имеет в обоих случаях два максимума – через 30 мин и 24 ч после облучения (рис. 1).

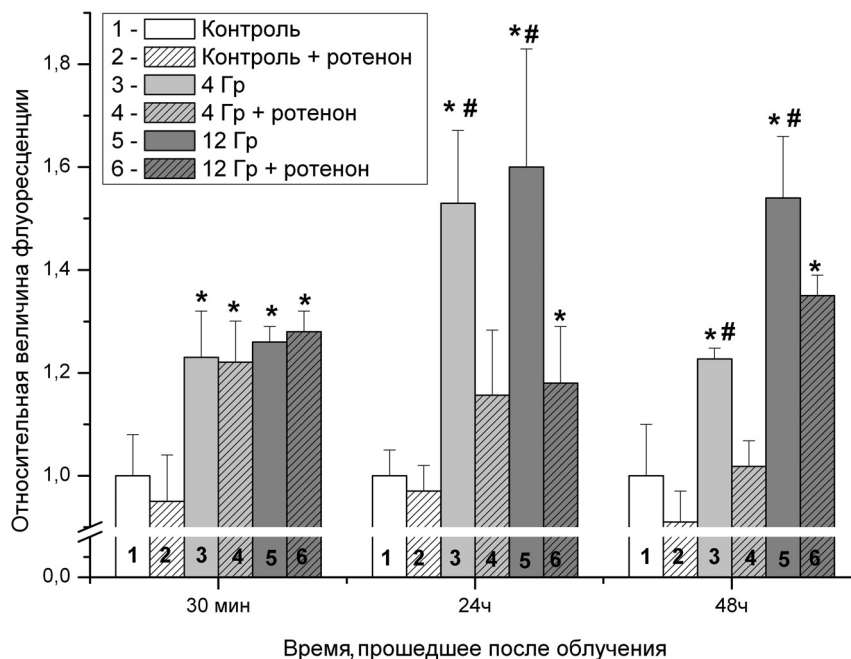


Рис. 2. Влияние ротенона на концентрацию АФК в клетках K562.

Данные представлены как отношение величины флуоресценции DCFH-DA в клетках, подвергшихся рентгеновскому облучения, к контрольной группе в присутствии ротенона и без него; * – $p < 0,05$ в сравнении с контрольной группой; # – $p < 0,05$ в сравнении с аналогичной группой без добавления ротенона

Источником АФК при нормальных условиях могут быть различные клеточные процессы, к которым можно отнести побочные продукты деятельности дыхательной цепи, НАДФН оксидазы, ксантин оксидазы и оксигеназы арахидоновой кислоты [3]. При облучении клеток добавляется еще один источник свободных радикалов – это радиолиз воды [1]. Однако, по мнению многих исследователей, самым значительным из них является митохондриальная дыхательная цепь [4]. Добавление ротенона вызывало снижение внутриклеточной концентрации АФК только во время второго максимума, т.е. 24–48 ч, тогда как добавление ротенона сразу после облучения не влияло на концентрацию АФК (рис. 2). На основании этого эксперимента мы сделали заключение, что сразу после облучения ведущая роль в генерации АФК не связана с митохондриями, тогда как позднее, начиная с 12 ч после облучения, главный вклад в развитие оксидативного стресса начинают вносить митохондрии.

Митохондриальный мембранный потенциал является важным показателем метаболической активности клеток, кроме этого, он отражает способность митохондрий генерировать АФК. Из ранее проведенных исследований известно, что генерация АФК зависит от митохондриального мембранного потенциала и с его увеличением количество АФК, генерируемых митохондрией, также увеличивается [14]. На рис. 3 представлены данные, отражающие

щие изменение митохондриального мембранного потенциала после облучения клеток в дозах 4 и 12 Гр. Если клетки облучались разовой дозой в 4 Гр, то статистически достоверное повышение мембранного потенциала митохондрий мы могли наблюдать только через 12 ч после облучения. В этот момент времени мембранный митохондриальный потенциал был в 1,12 раза больше, чем в контроле. Через 24 и 48 ч этот показатель составлял 1,22 и 1,14 от аналогичного показателя контрольной группы. В группе клеток, подвергшихся облучению мощностью 12 Гр, рост митохондриального мембранного потенциала был более существенным и наблюдался в более ранние сроки. Так, уже через 4 ч нами было зафиксировано статистически достоверное различие в сравнении с контрольной группой (рис. 3). В дальнейшем увеличение мембранного потенциала митохондрий в группе клеток, подвергшихся облучению в дозе 12 Гр, было еще более существенным с максимальным значением в точке 48 ч, в которой он был в 2,03 раза выше, чем в клетках контрольной группы. Увеличение продукции митохондриально-зависимой АФК, по нашему мнению, связано с повреждением митохондрий рентгеновским излучением из-за более высокой чувствительности митохондриальной ДНК к радиационному воздействию [15].

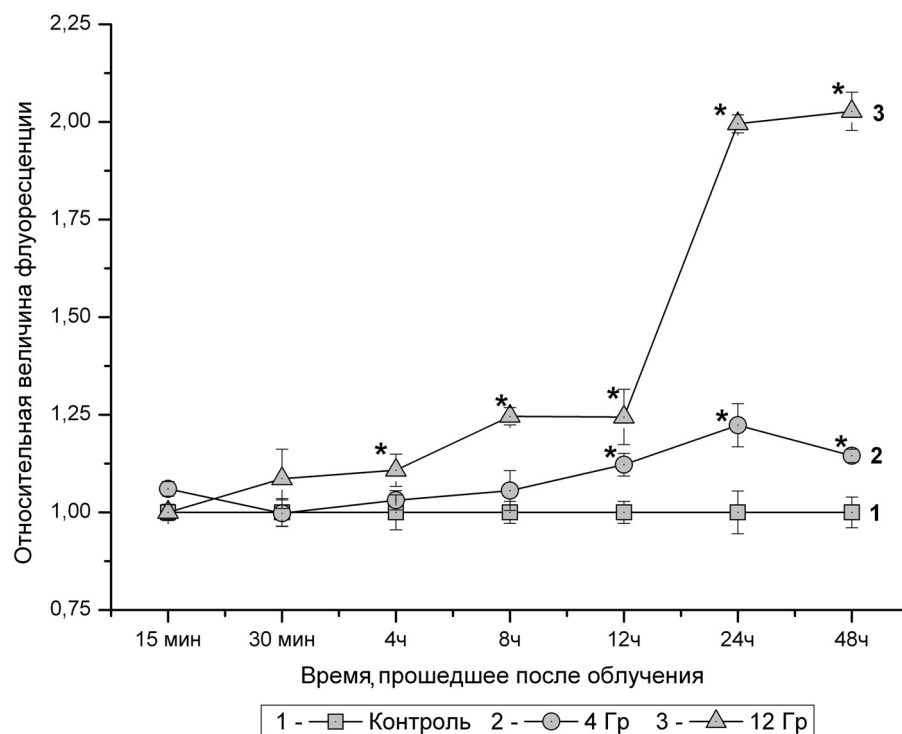


Рис. 3. Динамика изменения митохондриального потенциала после облучения клеток линии K562 рентгеновским излучением в дозе 4 и 12 Гр. Данные представлены как отношение величины флуоресценции TMRE в клетках, подвергшихся рентгеновскому облучению, к аналогичному показателю клеток контрольной группы; * – $p < 0,05$ в сравнении с контрольной группой

Таким образом, можно сделать заключение, что радиационно-индуцированная генерация АФК в клетках K562 имеет два временных максимума и

различные источники. Причиной увеличения радиационно-индуцированной концентрации АФК через 24–48 ч можно назвать рост митохондриального потенциала.

Список литературы

1. **Wardman, P.** The importance of radiation chemistry to radiation and free radical biology (The 2008 Silvanus Thompson Memorial Lecture) / P. Wardman // The British Journal of Radiology. – 2009. – V. 82. – P. 89–104.
2. **Le Caer, S.** Water Radiolysis: Influence of Oxide Surfaces on H₂ Production under Ionizing Radiation / S. Le Caer // Water. – 2011. – V. 3. – P. 235–253.
3. **Jones, D. P.** Radical-free biology of oxidative stress / D. P. Jones // Am. J. Physiol. Cell Physiol. – 2008. – V. 295. – P. 849–868.
4. **Kadenbach, B.** Intrinsic and extrinsic uncoupling of oxidative phosphorylation / B. Kadenbach // Biochim. Biophys. Acta. – 2003. – V. 1604. – P. – 77–94.
5. **Limoli, C. L.** Persistent Oxidative Stress in Chromosomally Unstable Cells / C. L. Limoli, M. I. Kaplan, E. Giedzinski, W. F. Morgan. // Free Radic. Biol. Med. – 2001. – V. 31. – P. 10–19.
6. **Regulus, P.** Oxidation of the sugar moiety of DNA by ionizing radiation or bleomycin could induce the formation of a cluster DNA lesion / P. Regulus, B. Duroux, P.-A. Bayle, A. Favier et al. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2007. – V. 104. – P. 14032–14037.
7. **Гурьев, Д. В.** Нестабильность генома, индуцированная ионизирующим излучением в клетках линии СНО, приводит к селекции радиорезистентных клеточных клонов / Д. В. Гурьев, А. Н. Осипов, Е. Ю. Лизунова, Н. Ю. Воробьева, О. В. Боева // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2009. – Т. 147 (5). – С. 525–527.
8. **Патрушев, М. В.** Элиминация мтДНК из митохондрий и активация ее репликации в клетках тканей облученных мышей / М. В. Патрушев, В. Е. Патрушева, В. А. Касымов и др. // Цитология. – 2006. – Т. 48, № 8. – С. 684–691.
9. **Kujoth, G. C.** Mitochondrial DNA Mutations, Oxidative Stress, and Apoptosis in Mammalian Aging / G. C. Kujoth, A. Hiona, T. D. Pugh et al. // Science. – 2005. – V. 309. – P. 481–484.
10. **Oyama, Y.** Characterization of 2',7'-dichlorofluorescein fluorescence in dissociated mammalian brain neurons: estimation on intracellular content of hydrogen peroxide / Y. Oyama, A. Hayashi, T. Ueha, K. Maekawa // Brain Res. – 1994. – V. 635, № 1–2. – P. 113–117.
11. **Li, N.** Mitochondrial Complex I Inhibitor Rotenone Induces Apoptosis through Enhancing Mitochondrial Reactive Oxygen Species Production / N. Li, K. Ragheb, G. Lawler et al. // J. Biol. Chem. – 2003. – V. 278. – P. 8516–8525.
12. **Gan, Z.** Quantifying mitochondrial and plasma membrane potentials in intact pulmonary arterial endothelial cells based on extracellular disposition of rhodamine dyes / Z. Gan, S. H. Audi, R. D. Bongard et al. // Am. J. Physiol. Lung. Cell. Mol. Physiol. – 2011. – V. 300. – P. L762–L772.
13. **Kim, G. J.** A Role for Mitochondrial Dysfunction in Perpetuating Radiation-Induced Genomic Instability / G. J. Kim, G. M. Fiskum, W. F. Morgan // Cancer Res. – 2006. – V. 66. – P. 10377–10383.
14. **Starkov, A. A.** Regulation of brain mitochondrial H₂O₂ production by membrane potential and NAD(P)H redox state / A. A. Starkov, G. Fiskum // J. Neurochem. – 2003. – V. 86. – P. 1101–1107.
15. **Yakes, F. M.** Mitochondrial DNA damage is more extensive and persists longer than nuclear DNA damage in human cells following oxidative stress / F. M. Yakes, B. Van Houten // Proc. Natl Acad. Sci. USA. – 1997. – V. 94. – P. 514–519.

Саенко Юрий Владимирович

кандидат биологических наук, старший научный сотрудник, Центр нанотехнологий и материалов, Ульяновский государственный университет

E-mail: saenkoymv@yandex.ru

Saenko Yury Vladimirovich

Candidate of biological sciences, senior staff scientist, Center of nanotechnologies and materials, Ulyanovsk State University

Шутов Александр Михайлович

доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой терапии и профессиональных болезней, Ульяновский государственный университет

E-mail: amshu@mail.ru

Shutov Alexander Mikhaylovich

Doctor of medical sciences, professor, head of sub-department of therapeutics and occupational diseases, Ulyanovsk State University

Напалкова Светлана Михайловна

доктор биологических наук, профессор, заведующий кафедрой общей и клинической фармакологии, Ульяновский государственный университет

E-mail: kfarm@ulsu.ru

Napalkova Svetlana Mikhaylovna

Doctor of biological sciences, professor, head of sub-department of general and clinical pharmacology, Ulyanovsk State University

Расторгуева Евгения Владимировна

старший преподаватель, кафедра общей и клинической фармакологии с курсом микробиологии, Ульяновский государственный университет

E-mail: kfarm@ulsu.ru

Rastorgueva Evgeniya Vladimirovna

Senior lecturer, sub-department of general and clinical pharmacology with a course of microbiology, Ulyanovsk State University

Маслакова Анна Геннадиевна

аспирант, Ульяновский государственный университет

E-mail: kfarm@ulsu.ru

Maslakova Anna Gennadyevna

Postgraduate student, Ulyanovsk State University

Серова Диана Валерьевна

студентка, Ульяновский государственный университет

E-mail: kfarm@ulsu.ru

Serova Diana Valeryevna

Student, Ulyanovsk State University

УДК 577.2.043:539.1

Радиационное излучение индуцирует отсроченный, митохондриально-зависимый оксидативный стресс в клетках лейкемии K562 / Ю. В. Саенко, А. М. Шутов, С. М. Напалкова, Е. В. Расторгуева, А. Г. Маслакова, Д. В. Серова // Известия высших учебных заведений. Поволжский регион. Медицинские науки. – 2012. – № 2 (22). – С. 11–18.