

УДК 577.34- 576.32/.36: 616-006.446

РЕНТГЕНОВСКОЕ ИЗЛУЧЕНИЕ ИНДУЦИРУЕТ МИТОХОНДРИАЛЬНО-ЗАВИСИМЫЙ ОКСИДАТИВНЫЙ СТРЕСС В КЛЕТКАХ ЛЕЙКЕМИИ K562

Саенко Ю.В., Шутов А.М., Абакумова Т.В., Долгова Д.Р., Воронова О.С.,
Благовская М.А.

*ФГБОУ ВПО «Ульяновский государственный университет»,
Ульяновск, e-mail: saenkoyn@yandex.ru*

Радиационно-индуцированное накопление активных форм кислорода и роль митохондрий в этом процессе изучалось с использованием культуры клеток лейкемии K562. Внутриклеточная концентрация активных форм кислорода (АФК), без и в присутствии ротенона и митохондриальный потенциал анализировались через 15, 30 минут, 1, 4, 8, 12, 24, 48 часов 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 минут и второй через 24 часа после облучения. Добавление ротенона к клеткам через 24 и 48 часов 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

X-RAY RADIATION INDUCES MITOCHONDRIA-DEPENDENT OXIDATIVE STRESS IN K562 LEUKEMIA CELLS

Saenko Y.V., Shutov A.M., Abakumova T.V., Dolgova D.R., Voronova O.S.,
Blagovskaya M.A.

Ulyanovsk State University, Ulyanovsk, e-mail: saenkoyn@yandex.ru

Radiation-induced accumulation of reactive oxygen species and the role of mitochondria in this process has been studied 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 a dose 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.

Keywords: oxidative stress, mitochondrial potential, X-ray radiation, reactive oxygen species

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) [15]. АФК возникают в результате радиолитического разложения 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, только гидроксильный радикал является непосредственным продуктом радиолитического разложения воды [8]. Супероксид анион радикал и перекись водорода называют вторичными АФК. Они генерируются в результате протекания цепных радикальных реакций инициируемых гидроксильным радикалом. Теоретические расчёты 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, ксантиноксидаза и ряд других процессов [4]. Основным поставщиком супероксид анион радикала и перекиси водорода являются митохондрии. При нормальных условиях от 1 до 4% кислорода, поглощаемых клеткой, превращается при участии дыхательной цепи в АФК [5]. Активные формы кислорода, генерируемые в процессе патологического клеточного метаболизма, могут выступать в качестве повреждающих агентов и инициировать клеточное повреждение и смерть [9]. Ионизирующее излучение может также вызывать повреждение биологических молекул путем разрыва химических связей. ДНК наиболее чувствительна к воздействию ионизирующего излучения, что проявляется через образование разрывов цепей ДНК, которые происходят в результате гидролитического разрыва

фосфодиэфирной связи после переноса свободного радикала с основания на рибозный остаток [12]. Процессы свободно-радикального повреждения ДНК служат причиной мутаций и возникновения генетической нестабильности приводящим к формированию радиорезистентных клеточных клонов [1]. Митохондриальная ДНК является менее защищённой от стрессовых воздействий, по сравнению с ядерной ДНК [2]. Радиация может оказывать существенное влияние на митохондрии, что проявляется через нарушение проницаемости митохондриальных мембран, нарушение синтеза АТФ, проникновение Ca^{2+} в митохондриальный матрикс и снижение митохондриального потенциала [7]. Таким образом, повреждённые 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.

Материал и методы исследования

В экспериментах использовали клеточную линию миелогенной лейкемии человека K562. Клетки культивировали при 37°C, во влажной атмосфере, содержащей 5% CO_2 . Для культивирования использовали среду RPMI-1649, содержащей 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 одноразово. 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 (объём лунки 2,5 мл). Параметры оксидативного стресса и повреждения ДНК анализировались через 15, 30 минут, 1, 4, 8, 12, 24, 48 часов.

Внутриклеточную концентрацию активных форм кислорода определяли с использованием 2',7'-дихлородигидрофлуоресцеин диацетата (DCFH-DA) [11]. DCFH-DA добавляли в среду с клетками в конечной концентрации 30 мкМ за 30 мин до анализа и держали в CO_2 -инкубаторе при 37°C 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 [10]. Ротенон добавляли в среду за 20 минут до начала определения АФК в конечной концентрации 1 мкМ.

Митохондриальный потенциал определяли с использованием флуоресцентного красителя этилового

эфира тетрадодиминперхлората (TMRE) [3]. TMRE добавляли в среду с клетками в конечной концентрации 200 мкМ за 20 мин до анализа и держали в CO_2 -инкубаторе при 37°C. После инкубации средой удаляли, добавляли равный объём 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 трёхкратным повторением. Результаты выражались как средние значения \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 и их обсуждение

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 минут после облучения и превосходит концентрацию АФК контрольных клеток в 1,35 и 1,67 раза при облучении клеток дозами 4 и 12 Грей соответственно. При определении концентрации АФК через 4 часа после облучения, оказалось, что она практически не отличается от таковой в контрольных клетках. Через 24 часа 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 часов 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 [10]. 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 минут после облучения. Ротенон снижал концентрацию АФК, если его добавляли к клеточной культуре через 24 и 48 часов после облучения (см. рис. 1). В точке 24 часа после добавления ротенона концентрация АФК в клетках облучавшихся дозами 4 и 12 Гр была всего лишь в 1,14 и 1,18 раз выше, чем в контрольной группе, тогда как без добавления ротенона она была соответственно в 1,52 и 1,61 раза выше, чем в контроле. В группе 4 Гр при добавлении

ротенона она статистически достоверно не отличалась от таковой в контрольной группе (см. рис. 1). При проведении аналогич-

ного эксперимента по прошествии 48 часов после облучения нами наблюдалась схожая картина.

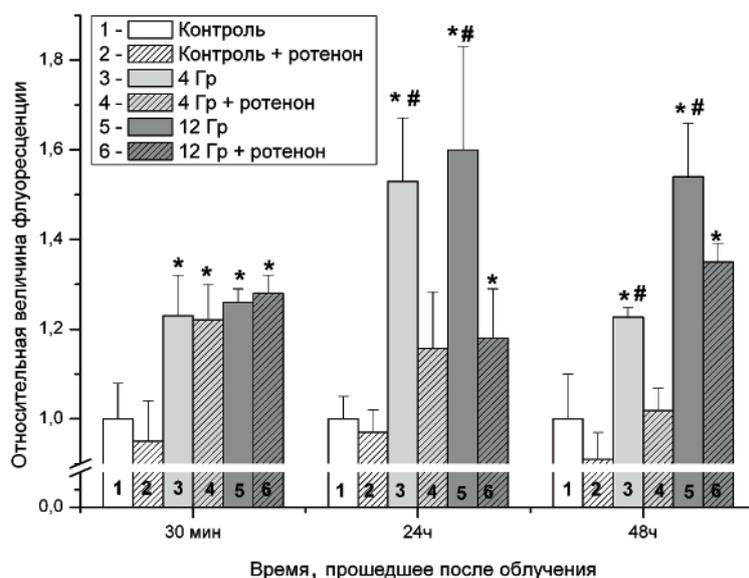


Рис. 1. Влияние ротенона на концентрацию АФК в клетках K562. Данные представлены как отношение величины флуоресценции DCFH-DA в клетках, подвергшихся рентгеновскому облучению в контрольной группе в присутствии ротенона и без него. (* – $p < 0,05$ в сравнении с контрольной группой, # – $p < 0,05$ в сравнении с аналогичной группой без добавления ротенона)

Радиационно-стимулированная генерация активных форм кислорода является давно известным фактом. Считается, что АФК служат основной причиной повреждающего действия радиации [15]. Также хорошо известно, что радиоактивное облучение может вызывать отдалённые последствия, связанные с возникновением нестабильности генома [1]. Генетически нестабильные линии клеток могут служить причиной злокачественной трансформации нормальных клеток и возникновения радиационно-устойчивых клонов раковых клеток [1]. В ряде работ продемонстрировано, что генетически нестабильные клетки характеризуются повышенной продукцией АФК, источниками которых могут являться митохондрии [2]. 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 [6]. В этой связи необходимо выяснить кинетику и источники радиационно-индуцируемых АФК на протяжении достаточного промежутка времени для возникновения признаков генетической нестабильности. Из результатов экспериментов видно, что внутриклеточная концентрация АФК после однократного облучения дозами 4 и 12 Гр имеет в обо-

их случаях два максимума через 30 минут и 24 часа после облучения (рис. 2).

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 [4]. При облучении клеток добавляется ещё один источник свободных радикалов – это радиолиз воды [15]. Однако, по мнению многих исследователей, самым значительным из них является митохондриальная дыхательная цепь [5]. Добавление ротенона вызывало снижение внутриклеточной концентрации АФК только во время второго максимума, т.е. 24–48 часов, 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 часа 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 проведённых исследований известно, что генерация АФК

зависит от митохондриального мембранного потенциала и с его увеличением количество АФК генерируемых митохондрией также увеличивается [13]. На рис. 3 представлены данные, отражающие 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 часов после облучения. В этот момент времени мем-

бранный митохондриальный потенциал был в 1,12 раза больше, чем в контроле. Через 24 и 48 часов 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 часа было зафиксировано статистически достоверное различие в сравнении с контрольной группой (см. рис. 3).

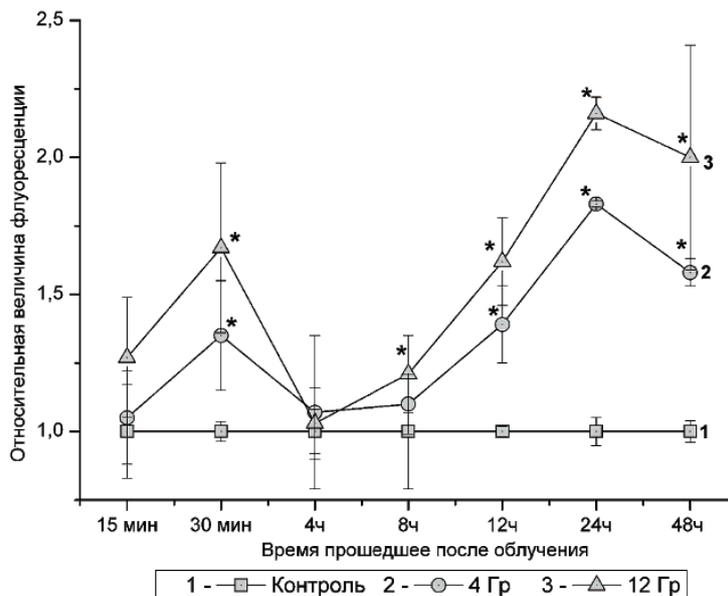


Рис. 2. Динамика изменения активных форм кислорода после облучения клеток линии K562 рентгеновским излучением в дозах 4 и 12 Гр

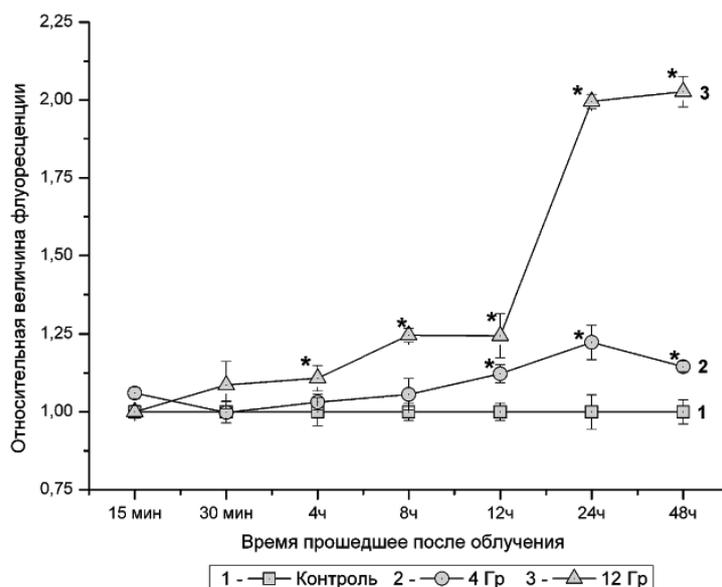


Рис. 3. Динамика изменения митохондриального потенциала после облучения клеток линии K562 рентгеновским излучением в дозе 4 и 12 Гр. Данные представлены как отношение величины флуоресценции TMRE в клетках, подвергшихся рентгеновскому облучению, к аналогичному показателю клеток контрольной группы. (*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

В дальнейшем увеличении мембранного потенциала митохондрий в группе клеток, подвергшихся облучению в дозе 12 Гр, был ещё более существенным с максимальным значением в точке 48 часов, 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 [14].

Заключение

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 часов можно назвать рост митохондриального потенциала.

Работа выполнена при поддержке государственного задания Минобрнауки России.

Список литературы

1. 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.
2. 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, Э.В. Евдокимовский, Т.Е. Ушакова, А.И. Газиев // Цитология. – 2006. – Т. 48, № 8. – С. 684–691.
3. Gan Z. Quantifying mitochondrial and plasma membrane potentials in intact pulmonary arterial endothelial cells based on extracellular disposition of rhodamine dyes / Z. Gan, Audi S.H., Bongard R.D., Gauthier K.M., Merker M.P. // Am. J. Physiol. Lung. Cell. Mol. Physiol. – 2011. V.300. – P. L762–L772.
4. Jones D.P. Radical-free biology of oxidative stress // Am. J. Physiol. Cell Physiol. – 2008. – V.295 – P. 849–868.
5. Kadenbach B. Intrinsic and extrinsic uncoupling of oxidative phosphorylation. // Biochim. Biophys. Acta. 2003. V. 1604 pp. 77–94.
6. 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.
7. Kujoth G.C. Mitochondrial DNA mutations, oxidative stress, and apoptosis in mammalian aging / G.C. Kujoth, A.Hiona, T.D.Pugh // Science. 2005. V.309. pp. 481–484.
8. Le Caer S. A trapped water network in nanoporous material: the role of interfaces // Water. 2011. V.3, №1. pp. 235–253.
9. Limoli C.L. Attenuation of radiation-induced genomic instability by free radical scavengers and cellular proliferation / C.L. Limoli, M.I. Kaplan, E. Giedzinski, W.F. Morgan // Free Radic. Bio. Med. 2001. V.31, №1. pp. 10–19.
10. Li N. Mitochondrial complex I inhibitor rotenone induces apoptosis through enhancing mitochondrial reactive oxygen species production. / N. Li, K. Ragheb, G. Lawler // J. Biol. Chem. 2003. V.278. pp. 8516–8525.
11. 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.
12. 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 // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2007. V. 104. pp. 14032–14037.
13. 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.
14. 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. pp. 514–519.
15. 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.

Рецензенты:

Генинг Т.П., д.б.н., профессор, заведующая кафедрой физиологии и патофизиологии Ульяновского государственного университета, г. Ульяновск;

Светухин В.В., д.ф.-м.н., профессор, директор Научно-исследовательского технологического института Ульяновского государственного университета, г. Ульяновск.

Работа поступила в редакцию 03.07.2012.