

ДОСЛІДЖЕННЯ ГЕТЕРОГЕННОСТІ СУБ-КЛОНІВ КЛІТИН ЛІНІЇ K562 МІЕЛОГЕННОЇ ЛЕЙКЕМІЇ ЛЮДИНИ

І.В. Чорна, к.біол.н., І.Ю. Висоцький, д.мед.н.

Сумський державний університет, м. Суми

РЕЗЮМЕ. Досліджували кінетику відновлення ДНК із використанням лужної версії методу ДНК-комет протягом 180 хв після одноразового опромінення в дозі 2 Гр або після дії 100 μM H_2O_2 . Відразу після дії стресових чинників в обох лініях клітин K562 (материнській і суб-клонах) виявлено підвищений рівень пошкоджень ДНК, однак у материнських клітинах первинний рівень пошкоджень ДНК був вищим, ніж у суб-клонів, що також відрізнялись і ефективнішим відновленням ДНК.

Ключові слова: клітини K562, суб-клони, опромінення, перекис водню, комет-аналіз, репарація ДНК.

РЕЗЮМЕ. Исследовали кинетику восстановления ДНК с использованием щелочной версии метода ДНК-комет в течении 180 мин после однократного облучения в дозе 2 Гр или после воздействия 100 μM H_2O_2 . Сразу после воздействия стрессовых факторов в обеих линиях клеток K562 (материнской и суб-клонах) установлено повышенный уровень поврежденной ДНК, однако в материнских клетках первоначальный уровень поврежденной ДНК был выше, чем у суб-клонов, которые также отличались и более эффективным восстановлением ДНК.

Ключевые слова: клетки K562, суб-клоны, облучение, перекись водорода, комет-анализ, репарация ДНК.

SUMMARY. In the present study, the DNA repair kinetics (using an alkaline version of the comet assay) up to 180 min after a single dose of 2 Gy or after influence of 100 μM H_2O_2 was studied. Immediately after the action of stress factors, both cell lines of K562 cells (parental and sub-clones) responded with increased levels of DNA damage. However, the induced damage was higher in parental cells than in sub-clones. Sub-clones also had more efficient DNA repair.

Keywords: K562 cells, sub-clones, irradiation, hydrogen peroxide, comet assay, DNA repair.

Активация сигнальних механізмів, які забезпечують виживання пухлинних клітин у відповідь на дію стресових чинників, може бути причиною обмеженої ефективності хіміо- та радіотерапії.

Важливе значення щодо аналізу проблеми стійкості пухлинних клітин до терапії мають дослідження, які проводяться на моделях експериментально одержаних резистентних клітинних ліній (селективний відбір клітинних суб-клонів під впливом терапевтичних агентів; внесення до клітин за допомогою вірусних векторів генів, відповідальних за виживання клітин у несприятливих умовах і т. п.) [1, 2]. Дослідження чутливості цих клітин до дії стресових чинників різної природи і змін, що виникають при цьому, а також з'ясування механізмів координованої регуляції різних захисних систем клітини, які можуть визначати перехресну резистентність пухлини до пошкодження, — необхідний етап передклінічних досліджень нових підходів, спрямованих на вибіркоче й ефективне зниження стійкості ракових клітин до протипухлинної терапії *in vivo* [3].

Хронічна мієлогенна лейкемія характеризується порушеннями хромосомного набору, які виражаються в появі філадельфійської хромосоми: реципрокної транслокації довгих ланцюгів хромосом 9 і 22. І як наслідок — спостерігається конститутивна активація *Bcr-Abl* тирозинкінази, що, вірогідно, призводить до виникнення підвищеної стійкості клітин як до

променевої терапії, так і до хіміотерапії, однак механізми такої резистентності вивчені недостатньо [4].

Метод ДНК-комет є одним з найбільш перспективних методів, який може бути використаний для оцінки пошкоджень ДНК та їх репарації, дослідження генотоксичності фармацевтичних препаратів і промислових хімічних речовин, візуалізації апоптичних клітин, оцінки схильності до онкологічних захворювань і реакції на проведену протипухлинну терапію та ін. [5-7].

Метою роботи було порівняння впливу генотоксичних чинників (іонізуюче випромінювання, перекис водню) на пошкодження ДНК та їхню репарацію у клітинах лінії K562 і суб-клонах клітин K562, одержаних після дії одноразового рентгенівського опромінення.

Матеріали та методи дослідження

Клітини лінії K562 (мієлогенна лейкемія людини) вирощували в середовищі RPMI 1640 ("Sigma", США), за присутності 10% декомплементованої ембріональної сироватки великої рогатої худоби (FCS, "Sigma", США) і 50 мкг/мл гентаміцину. Культивовані клітини підтримували в зволоженій атмосфері з 5% CO_2 при 37°C.

Для опромінення клітин було використано рентгенівську установку Clinac 600 ("Varian", США) Потужність дози становила 1 Гр хв. Селективний відбір суб-клонів клітин лінії K562 здійснювали після одноразового опромінення в дозі 4 Гр.

Для оцінки пошкоджень ДНК, викликаних дією перекису водню, клітини обробляли 100 μM H_2O_2 протягом 1 хвилини у безсироватковому середовищі при 37°C, після чого їх осаджували центрифугуванням протягом 5 хвилин при 170 g та двічі промивали охолодженим забуференим фізіологічним розчином (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 4,3 mM Na_2HPO_4 , 1,4 mM KH_2PO_4 , pH 7,4) із центрифугуванням за таких самих умов (5 хвилин, 170 g) для видалення залишкового H_2O_2 .

Інтенсивність росту клітинної культури та відсоток мертвих клітин визначали після їх фарбування розчином трипанового синього (кінцева концентрація 0,1%, час фарбування — 5 хв) та підрахунку зафарбованих (мертвих) і незафарбованих (живих) клітин під інвертованим мікроскопом у цитометричній камері Фукса-Розенталя

Для виявлення індукованих радіацією чи перекисом водню розривів ДНК та їх репарації використовували гель-електрофорез одиничних клітин (Single Cell Gel Electrophoresis Assay, SCGE) або метод ДНК-комет за умов лужного рН згідно загальноприйнятих методик [6, 8] та з деякими модифікаціями, як було нами описано раніше [9]. У різні часові інтервали (0, 15, 30, 60, 120 та 180 хв) після дії іонізуючої радіації чи H_2O_2 , відбирали аліквоти суспензії клітин (2×10^4 у 50 мкл) для комет-аналізу. Комети зафарбовували розчином бромистого етидію (20 мкг/мл), оглядали під флюоресцентним мікроскопом та класифікували на 5 категорій (A_0 — A_4) згідно з класифікацією, розробленою Коллінзом [6, 10]. Для кожного експериментального зразка обробляли по 100 зображень комет. Середній рівень пошкоджень ДНК (D) в умовних одиницях (у.о.) визначали за формулою: $D = A_1 + 2 \times A_2 + 3 \times A_3 + 4 \times A_4$ [8, 11], де A_1, A_2, A_3, A_4 — кількість комет відповідних класів. Таким чином, підрахований загальний рівень пошкоджень ДНК у зразку може коливатись від 0 (100% комет категорії A_0) до 400 у.о. (100% комет категорії A_4).

Варіаційно-статистичне опрацювання отриманих результатів проводили з використанням критерію Стьюдента за допомогою комп'ютерної програми Microsoft Excel.

Результати дослідження та їх обговорення

Іонізуюче випромінювання викликає ряд пошкоджень ДНК, серед яких одно- та дволанцюгові розриви, пошкодження азотистих основ та залишків цукрів, виникнення між- та внутрішньониткових зшивок ДНК-ДНК та ДНК-білок, поява хромосомних аберацій. Вважається, що опромінення змінює стан клітинних захисних механізмів: систем антиоксидантного захисту, репарації ДНК, регуляції клітинного циклу і апоптозу [12]. Дія іонізую-

чої радіації може спричиняти як виникнення ефекту зниження чутливості клітин до наступного опромінення (адаптивна відповідь), так і підвищення радіочутливості (гіперчутливість до опромінення) [13, 14]. У формуванні ефектів опромінення беруть участь різні сигнальні шляхи, в які залучена низка білків, зокрема PARP, p53, протеїнкінази (c-Abl, ATM), Rad1, Rad9, Rad17, Hus1 та ін. [15]. Однак, дотепер немає єдиної думки про те, на які клітинні пошкодження активуються системи клітинної відповіді на дію радіації.

У дослідах, в яких клітини K562 та суб-клони клітин K562, ізольовані після одноразового опромінення в дозі 4 Гр, піддавали дії рентгенівського опромінення (2,0 Гр), було встановлено зменшення приросту цих клітин порівняно з неопроміненими клітинами (рис. 1). Даний ефект залежав від часу, і його величина зростала зі збільшенням тривалості культивування клітин після припинення дії радіації. Так, культивування клітин K562 та суб-клонів цих клітин протягом 72 год після опромінення супроводжувалось пригніченням клітинного росту на 30-32% порівняно з контрольними (неопроміненими) клітинами. Слід також зазначити, що суб-клони клітин K562 росли повільніше порівняно з батьківськими клітинами лінії K562 (рис. 1). Раніше нами було встановлено, що дія рентгенівського опромінення (2, 5, 10 Гр) призводила до дозозалежного інгібування росту клітин K562, що зумовлене, головним чином, пригніченням їхньої проліферативної активності, а не загибеллю [9].

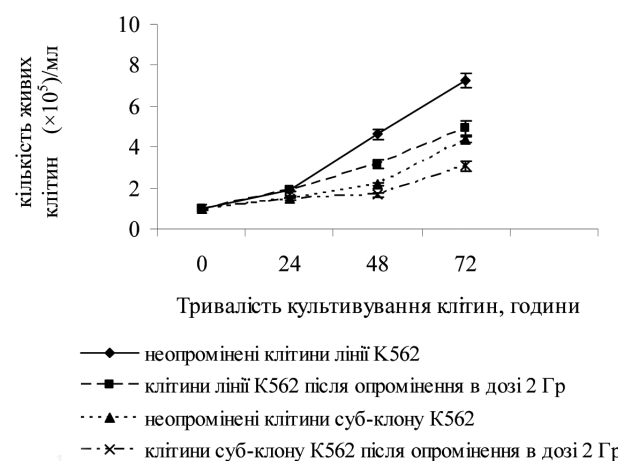


Рис. 1. Вплив іонізуючого випромінювання на проліферацію клітин лінії K562 та суб-клонів клітин K562.

Серед пошкоджень ДНК, викликаних дією іонізуючого опромінення, особливу увагу дослідників привертають одно- та дволанцюгові розриви ДНК. Одноланцюгові розриви швидко репарують. Дволанцюгові розриви, не

усунені в процесі репарації ДНК, призводять до цитогенетичних порушень і загибелі клітин. З іншого боку, неправильно репаровані розриви ДНК можуть спричиняти виникнення мутацій чи генетичних перебудов у клітинах, які вижили [12].

Наступним кроком наших досліджень було перевірити: відмінності в чутливості потомків опромінених клітин до дії стресових чинників відбуваються завдяки запобіганню утворення розривів ДНК чи активізації процесів репарації ДНК. Дослідження пошкоджень і репарації ДНК проводили з використанням комет-аналізу. Даний метод дозволяє за допомогою гель-електрофорезу ізольованих клітин, ДНК яких зафарбована флюоресцентним барвником, отримувати зображення, що нагадують "голову" та "хвіст" комети. Інтенсивність флюоресценції "хвоста" комети, який утворюється в результаті міграції в гелі агарози пошкоджених або розплетених ділянок ДНК, відображає рівень пошкодження ДНК [7, 11].

Для того, щоб оцінити чутливість методу та його здатність розпізнавати різні типи ушкоджень ДНК, нами були використані генотоксичні агенти, що відрізняються за механізмом дії (іонізуюче випромінювання, перекис водню).

Надлишкова активація реакцій вільнорадикального окиснення являє собою типовий па-

Причинами цього можуть бути як порушення функцій мітохондрій, так і пригнічення ендогенних антиоксидантних систем, що нейтралізують вільні радикали. Перекис водню спричиняє одно- та дволанцюгові розриви ДНК після перетворення на гідроксильний радикал через реакцію Фентона, хоча дія кальцій-залежних нуклеаз та пероксидаз ліпідів є також проявом генотоксичної дії перекису водню [16].

Встановлено, що у неопромінених клітинах лінії K562 та у суб-клонах K562 рівень ендогенних пошкоджень ДНК не перевищував 95 у.о. (табл. 1). У клітинах K562, які тестували відразу (0 хв) після опромінення, спостерігали, головним чином, появу $72 \pm 5\%$ комет класу A_2 (у комет цього класу кількість ДНК, яка знаходиться у "хвості" комети, становить менше 20%) та $25 \pm 3\%$ комет класу A_1 (містять менше 5% ДНК у "хвості"). Кількість комет класів A_0 (немає пошкоджень ДНК), A_3 (кількість ДНК у "хвості" становить від 20 до 75%) та A_4 (більше 75% ДНК розміщується у "хвості" комети) за даних експериментальних умов становила менше 3%. Виявлено, що рівень початкових пошкоджень ДНК, викликаних дією іонізуючої радіації, у суб-клонів K562 був меншим, порівняно з рівнем пошкоджень ДНК у "батьківських" клітинах даної лінії (табл. 1).

Таблиця 1

Вплив рентгенівського випромінювання на індукцію пошкоджень ДНК та їхню репарацію у клітинах лінії K562 та суб-клонах K562

Доза опромінення (Гр)	Кількість підрахованих клітин	Час після опромінення (хв)	Рівень пошкоджень ДНК (у.о.)	
			клітини K562	суб-клони K562
0	100	0	$87,2 \pm 7,34$	$77,0 \pm 4,21$
2	100	0	$181,7 \pm 6,44^{***}$	$149,8 \pm 5,96^{***}$
2	100	15	$133,4 \pm 4,12^{***}$	$113,9 \pm 5,42^{***}$
2	100	30	$128,6 \pm 5,53^{***}$	$110,3 \pm 3,74^{***}$
2	100	60	$121,2 \pm 8,84^{**}$	$105,1 \pm 4,89^{***}$
2	100	120	$107,1 \pm 3,45^*$	$97,2 \pm 6,15^{**}$
2	100	180	$104,2 \pm 2,14^*$	$88,1 \pm 7,11$

Примітка: відмінність між неопроміненими та опроміненими клітинами вірогідна

* — $p < 0,05$, ** — $p < 0,01$, *** — $p < 0,001$

тологічний процес, що має місце при найрізноманітніших захворюваннях і дії пошкоджуючих факторів на організм. Початковим етапом розвитку окиснювального стресу є надлишкове утворення активних форм кисню, таких як гідроксильний радикал, супероксид-аніон, перекис водню та синглетний кисень.

У клітинах лінії K562 та у суб-клонах цієї лінії, які тестували на різні терміни (0, 15, 30, 60, 120, 180 хв) після опромінення в дозі 2 Гр, репарація односторонніх розривів ДНК найбільш інтенсивно здійснювалась протягом перших 30 хв після опромінення (табл. 1). Слід відзначити, що після 180 хв культивування оп-

**Вплив перекису водню на індукцію пошкоджень ДНК та їхню
репарацію у клітинах лінії K562 та суб-клонах K562**

Концентрація H ₂ O ₂ (μM)	Кількість підрахованих клітин	Час після дії H ₂ O ₂ (хв)	Рівень пошкоджень ДНК (у.о.)	
			клітини K562	суб-клони K562
0	100	0	70,0±8,58	67,4±6,05
100	100	0	251±12,33***	207,2±6,46***
100	100	15	110±9,04**	92,7±5,42**
100	100	30	88±1,58*	72,3±5,21
100	100	60	84±4,19	68,2±4,86
100	100	120	78±2,49	66,9±2,61
100	100	180	82±2,08	66,4±3,33

Примітка: відмінність між необробленими та обробленими перекисом водню клітинами вірогідна

* — $p < 0,05$, ** — $p < 0,01$, *** — $p < 0,001$

роміненних клітин залишкові нерепаровані пошкодження були виявлені у "батьківських" клітинах лінії K562, тоді як у суб-клонів K562 на 180 хв після дії іонізуючої радіації не було виявлено достовірних змін у ступені пошкодження ДНК порівняно з неопроміненими клітинами цієї сублінії (табл. 1).

Як видно із таблиці 2, рівень початкових пошкоджень ДНК, викликаних дією H₂O₂ у суб-клонів K562 менший, порівняно з рівнем пошкоджень ДНК у "батьківських" клітинах лінії K562. У суб-клонах K562, які тестували відразу (0 хв) після дії H₂O₂, виявлені в основному комети класів A₂ (88±4%) і A₃ (10±0,5%), тоді як у клітинах K562 за даних експериментальних умов кількість комет класів A₂ і A₃ становила 54±5% і 37±2%, відповідно. Інкубація клітин K562 (протягом 3 годин при 37°C) після дії 100 μM H₂O₂ призводила до зменшення кількості ДНК у "хвостах" комет завдяки репарації ДНК, яка найбільш ефективно відбувалась протягом перших 15 хв після впливу H₂O₂. Так, на 15 хв після культивування "батьківських" клітин лінії K562 виявлені комети класів A₁ (74±1%) і A₂ (15±5%), тоді як у суб-клонів K562 — A₀ (20±4%) і A₁ (73±5%). Повну репарацію пошкоджень ДНК у суб-клонах K562 спостерігали на 30 хв, а в "батьківських" клітинах K562 — на 60 хв після дії H₂O₂ (табл. 2).

Отже, селективну перевагу пухлинним клітинам забезпечує не тільки тимчасова активація їх захисних механізмів, індукована у відповідь на дію пошкоджуючого фактора (хімічної чи фізичної природи), але й інші

властивості, такі як прискорене розмноження, зміна чутливості до факторів росту та ін. Індукція первинних змін, що викликають резистентність пухлин до дії пошкоджуючих факторів, відбувається як на молекулярному, так і на клітинному рівні та не виключає участі у подальшому змін на більш високих рівнях організації живої матерії (міжклітинні взаємодії, тканина, системи органів, організм) [3].

Завдяки високій чутливості модифікований лужний варіант методу ДНК-комет може бути використаний для оцінки генотоксичності лікарських засобів, при контролі результатів лікування та індивідуального підбору ДНК-тропних лікарських препаратів. У подальшій роботі планується дослідити експресію білків, що регулюють клітинний цикл та апоптоз у батьківських клітинах K562 та суб-клонах цих клітин, а також з'ясувати, протягом скількох поколінь в опромінених клітинах зберігається чутливість/резистентність до індукції одно- та дволанцюгових розривів ДНК.

Висновки

1. Результати наших досліджень *in vitro* з використанням комет-аналізу дозволяють визначити диференціальну чутливість до дії генотоксичних чинників як клітинних ліній, так й їхніх суб-клонів, одержаних після дії одноразового іонізуючого опромінення.
2. Відмінності в чутливості суб-клонів клітин K562 порівняно з "батьківськими" цієї лінії до дії іонізуючої радіації та перекису водню можуть бути спричинені відмінностями в ДНК-репаруючій здатності цих клітин: у суб-клонів клітин K562 виявлений нижчий

рівень початкових пошкоджень ДНК під впливом досліджуваних стресових чинників та вища швидкість їхньої репарації.

3. Таким чином, навіть дія одноразового іонізуючого опромінення в дозі 4 Гр індукує

виникнення епігенетичних змін у клітинах лінії K562, що може спричинити виникнення тимчасової резистентності суб-клонів цих клітин до дії радіації та перекису водню.

ЛІТЕРАТУРА

1. Alexandrova S.A. Genetic variability of the mouse hepatoma cells MH-22a revealed by RAPD-PCR-fingerprinting under different conditions of cultivation / S.A. Alexandrova, I.N. Shvemberger // *Exp. Oncol.* — 2005. — V. 27, № 2. — P. 114—119.
2. Svirnovski A. Attempts to influence the drug resistance of tumor cells in experimental system / A. Svirnovski, V. Pasiukov // *Exp Oncol.* — 2005. — V. 27, № 1. — P. 43—46.
3. Свирновский А.И. Молекулярные основы феномена химио- и радиорезистентности при опухолевых процессах / А.И. Свирновский, В.В. Пасюков // *Медицинские новости.* — 2007. — № 11. — С. 7—19.
4. Goldman J.M. Chronic myeloid leukemia — advances in biology and new approaches to treatment / J.M. Goldman, J.V. Melo // *N. Engl. J. Med.* — 2003. — V. 349, №15. — P. 1451—1464.
5. Сорочинская У.Б. Применение метода ДНК-комет для оценки повреждений ДНК, вызванных различными агентами окружающей среды / У.Б. Сорочинская, В.М. Михайленко // *Онкология.* — 2008. — Т. 10, № 3. — С. 303—309.
6. Dusinska M. The comet assay in human biomonitoring: gene-environment interactions / Maria Dusinska, Andrew R. Collins // *Mutagenesis.* — 2008. — V. 23, № 3. — P. 191—205.
7. Trzeciak A.R. A Modified Alkaline Comet Assay for Measuring DNA Repair Capacity in Human Populations / A.R. Trzeciak, J. Barnes, M.K. Evans // *Radiation Research.* — 2008. — V. 169, № 1. — P. 110—121.
8. Relationships between acute reactions to radiotherapy in head and neck cancer patients and parameters of radiation-induced DNA damage and repair in their lymphocytes / J. Rzeszowska-Wólny, O. Palyvoda, J. Polanska [et al.] // *Int. J. Radiat. Biol.* — 2008. — V. 84, № 8. — P. 635—642.
9. Чорна І.В. Оцінка індукованих радіацією пошкоджень ДНК та їхньої репарації у клітинах лінії K562 мієлогенної лейкемії людини / І.В. Чорна, І.Ю. Висоцький // *Современные проблемы токсикологии.* — 2010. — №1. — С. 42—46.
10. Collins A.R. Investigating oxidative DNA damage and its repair using the comet assay / Andrew R. Collins // *Mutat. Res.* — 2009. — V. 681, № 1. — P. 24—32.
11. The comet assay: topical issues / A.R. Collins, A.A. Oscoz, G. Brunborg [et al.] // *Mutagenesis.* — 2008. — V. 23, № 3. — P. 143—151.
12. Willers H. Repair of radiation damage to DNA / H. Willers, J. Dahm-Daphi, S.N. Powel // *Br J Cancer* — 2004 — V. 90, № 7 — P. 1297—1301.
13. Индукция и репарация двуниевых разрывов ДНК в лимфоцитах крови человека, облученных в адаптирующей дозе / А.Н. Осипов, Е.Ю. Лизунова, Н.Ю. Воробьева, И.И. Пелевина // *Радиационная биология. Радиоэкология.* — 2009. — Т. 49, № 1. С. 42—45.
14. Seymour C.B. Relative contribution of bystander and targeted cell killing to the low-dose region of the radiation dose-response curve / Colin B. Seymour, Carmel Mothersill // *Radiat. Res.* — 2000. — V. 153, № 5. — P. 508—511.
15. Radiation-induced intercellular signaling mediated by cytochrome-c via a p53-dependent pathway in hepatoma cells / M He, M Zhao, B Shen [et al.] // *Oncogene.* — 2011. — V. 30, № 16. — P. 1947—1955.
16. Lopez-Lazaro M. Dual role of hydrogen peroxide in cancer: possible relevance to cancer chemoprevention and therapy / M. Lopez-Lazaro // *Cancer Letters.* — 2007 — V. 252, № 4 — P. 1—8

Надійшла до редакції 9.04.2012 р.