

## 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

*Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пуццино;  
электронный адрес: patrushevmaxim@rambler.ru*

Необходимым условием для нормального функционирования митохондрий, а значит, и клеток в целом является поддержание определенного количества неповрежденных молекул мтДНК. Мы исследовали изменение количества копий мтДНК в клетках тканей головного мозга и селезенки мышей, подвергнутых воздействию ионизирующей радиации. Впервые был обнаружен радиационно-индуцированный выход фрагментов мтДНК в цитозоль клеток мозга и селезенки. Показано, что в цитозоле клеток головного мозга и селезенки мышей через 5 ч после облучения в дозе 5 Гр появляются фрагменты мтДНК размером 1841 пар нуклеотидов (п.н.), которые сохраняются в течение по крайней мере 3 нед. Кроме того, в цитозоле клеток головного мозга мышей после облучения обнаружены и более крупные фрагменты мтДНК (размером 10 090 п.н.). Появление фрагментов мтДНК в цитозоле клеток головного мозга сопровождается увеличением количества копий мтДНК в митохондриях. Индукцию репликации мтДНК в клетках мозга облученных животных можно рассматривать как развитие компенсаторной реакции в ответ на повреждение мтДНК. Резкое падение количества копий мтДНК в митохондриях селезенки в 1-е сут после облучения объясняется развитием программируемой клеточной гибели, однако в более поздние сроки, как и в мозге, мы наблюдаем компенсаторную реакцию.

Ключевые слова: мтДНК, репликация, ПЦР, облучение, головной мозг, селезенка.

Принятые сокращения: АФК — активные формы кислорода, ИР — ионизирующая радиация, мтДНК — митохондриальная ДНК, п.н. — пары нуклеотидов, ПЦР — полимеразная цепная реакция, яДНК — ядерная ДНК.

Соматические клетки млекопитающих содержат несколько тысяч копий кольцевых молекул митохондриальной ДНК (мтДНК) размером около 16 000 п. н., несущих набор генов, кодирующих белки митохондриальной электронно-транспортной цепи, которая обеспечивает функцию АТФазы — одного из главных ферментативных комплексов синтеза АТФ (Рара, 1996). Синтез АТФ в митохондриях сопровождается производством значительного количества побочного продукта — активных форм кислорода (АФК), способных вызывать больше повреждений в мтДНК по сравнению с соразмерным участком ядерной ДНК (ядНК). При действии многих химических агентов на клетки в мтДНК возникает больше повреждений, чем в яДНК, поскольку митохондрии способны накапливать липофильные катионы (Рара, 1999). Было также продемонстрировано, что в мтДНК клеток, подвергнутых действию ионизирующей радиации, повреждения возникают с большей частотой, чем в яДНК (May, Bohr, 2000; Chung et al., 2001). Повреждения в генах мтДНК вызывают переориентировку цепи переноса электронов, что приводит к увеличению продукции АФК и развитию окислительного стресса и соответственно формированию повреждений в мтДНК (Wallace, 2001). Так, в митохондриях облученных Т-клеток крови человека наблюдали усиление продукции АФК в течение нескольких часов пострадиационного времени и как след-

ствие — увеличение повреждений ДНК и мембран этих органелл (Ogawa et al., 2003). Несмотря на то что мтДНК больше повреждается, чем яДНК, системы репарации ДНК в митохондриях не функционируют или функционируют с низкой эффективностью (Dianov et al., 2001; LeDoux, Wilson, 2001; Газиев, Подлуцкий, 2003). Более того, было показано, что биосинтез мтДНК в клетках и тканях млекопитающих, подвергнутых радиационному воздействию, не подавляется тогда, когда в этих же условиях происходит блокировка репликации яДНК (Chang, Looney, 1966; Vaugnet-Mahieu et al., 1970; Cleaver, 1992; May, Bohr, 2000; Газиев, Подлуцкий, 2003). Очевидно, повышенное количество повреждений мтДНК и низкая эффективность их репарации, а также отсутствие блокировки репликации поврежденной ДНК в митохондриях в значительной мере способствует закреплению изменений в мтДНК, которые могут приводить к нарушению энергозависимых путей клеточного метаболизма, развитию дегенеративных процессов, «митохондриальных» болезней и ускорению старения (Lallev et al., 1993; Wallace, 2001). В связи с этим исследование повреждения мтДНК, закрепления структурных изменений в мтДНК и ее сохранение в клетках тканей млекопитающих, подвергнутых радиационному воздействию, представляет значительный интерес. Как показывают результаты исследований, в клетках в условиях повышенного окислитель-

ного стресса и, возможно, после воздействия других повреждающих агентов наряду с повреждением мтДНК и формированием в ней структурных перестроек наблюдается индукция биогенеза митохондрий и (или) полиплоидизации мтДНК (Lee et al., 2000; Yen et al., 2002; Nisoli et al., 2003; Carew et al., 2004; Kamal, French, 2004; Kang, Namasaki, 2005).

В настоящей работе мы исследовали появление фрагментов мтДНК в цитозоле клеток тканей головного мозга и селезенки и изменение количества копий мтДНК в клетках этих же тканей мышей в различное время после воздействия на них ионизирующей радиации.

### Материал и методика

В настоящем исследовании использовали мышей линии Balb/C, полученных из питомника экспериментальных животных филиала Института биоорганической химии РАН (Пушино). Облучение в дозе 5 Гр проводили на установке ГУБЕ (Со), мощность облучения — 1.8 Гр/мин. После облучения мышей содержали в стандартных условиях вивария ИТЭБ РАН. Через определенные сроки после облучения (5, 24, 72 ч и 7 сут) мышей декапитировали и извлекали ткани животных. В работе использовали реагенты производства компании Sigma-Aldrich (США), для проведения ферментативных реакций — компании Invitrogen (США).

Выделение митохондрий мозга. Митохондрии выделяли из мозга мышей согласно методике (Brustovetsky, Dubinsky, 2002). После декапитации мозг быстро извлекали и помещали в ледяную среду выделения (СВ), содержащую: маннит — 225 мМ, сахароза — 75 мМ, ЭГТА — 1 мМ, бычий сывороточный альбумин (БСА) — 0.1 % и NERES — 10 мМ, pH 7.4. Изолированный мозг промывали 2—3 раза в ледяной СВ, затем измельчали хирургическими ножницами в чашке Петри с небольшим количеством СВ. Измельченную ткань помещали в стеклянный гомогенизатор с тефлоновым пестиком, приливали ледяную СВ (9 объемных частей) и гомогенизировали вручную 3—4 проходами пестика. К полученному гомогенату приливали равный объем СВ и центрифугировали при 2° С при ускорении 2000 g 10 мин. Супернатант переносили в чистую пробирку и центрифугировали при ускорении 12 000 g 10 мин. Супернатант принимали за цитозольную фракцию, а полученный осадок митохондрий ресуспендировали в 20 мл среды, содержащей: маннит — 225 мМ, сахароза — 75 и NERES — 10 мМ. После центрифугирования при ускорении 12 000 g в течение 10 мин осадок митохондрий использовали для экспериментов. Измерение количества белка в изолированных митохондриях проводили методом Лоури с использованием БСА в качестве стандарта.

Выделение ДНК. К 30 мкл фракции митохондрий добавляли 210 мкл лизирующего буферного раствора (4 М тиоцианата гуанидина, 25 мМ натрия цитрат, pH 7.0, и 0.5%-ный саркозил), 30 мкл 1 М Трис-НСl, pH 8.0, 30 мкл 4 М NaCl, 350 мкл фенола, насыщенного Трис-НСl, pH 8.0, и 60 мкл хлороформа, гомогенизировали, оставляя в холодильнике на 20 мин, затем центрифугировали в течение 3 мин при 6000 об/мин на центрифуге Eppendorf 5415. К водной фазе добавляли два объема 96%-ного этанола и оставляли на ночь (–20° С). Осадок дважды промывали 70%-ным спиртом, подсушивали на воздухе и растворяли в 50 мкл буферного рас-

### Олигонуклеотиды, использованные для проведения ПЦР

Название	Последовательность 5'-3'	Продукт (п. н.)
Co1F	CCCAATTCTCTACCAGCATC	343
Co1R	GGCTCATAGTATAGCTGGAG	
MAF	CGACAGCTAAGACCCAAACTGGG	316
MAR	CCCATTCTTCCCATTTCATTGGC	
Dlfor	CTATTAATCTACCATCCTCCGTGA	349
Dlrev	TAGGTGATTGGGTTTTCGGACTA	
Mmit1for	GCCAGCCTGACCATAGCCATAA TAT	10090
Mmit1rev	GAGAGATTTTATGGGTGTAATGC GG	
Mmit2for	CCCAGCTACTACCATCATCAAGT	117
Mmit2probe	JOE-TTGCCGCTACCCCAATCCCTC CTCCAACAT-BHQ2	
MC1F	CCACTCATTTCATTGACCTACCT GCC	1841
Dlrev	TAGGTGATTGGGTTTTCGGACTA	
Pro3betaF	AGAGGGAAATCGTGCGTGAC	153
Pro4betaR	CAATAGTGATGACCTGGCCGT	
Pro5betaprobe	Rox-CACTGCCGCATCCTCTTCTC CC-BHQ	201
gapdhF	GTGAGGGAGATGCTCAGTGT	
gapdhR	CTGGCATTGCTCTCAATGAC	

вора TE (10 мМ, Трис-НСl, pH 8.0, и 1 мМ ЭДТА). ДНК цитозольной фракции выделяли сорбцией на магнитных сорбентах. Цитозольную фракцию смешивали с равным объемом лизирующего буферного раствора (4 М тиоцианата гуанидина, 25 мМ натрия цитрата, pH 7.0, и 0.5%-ный саркозил). К аликвоте лизата добавляли 1/10 объема 1 М Трис-НСl, pH 8.0, NaCl до конечной концентрации 1 М и 10—15 мкл магнитных сорбентов. После инкубации в течение 15 мин при 55° С проводили связывание магнитных сорбентов в магнитном поле. Элюцию ДНК с сорбентов осуществляли в буферном растворе TE в течение 15 мин при 65° С.

Полимеразную цепную реакцию (ПЦР) проводили в объеме 20 мкл в буферном растворе, содержащем 10 мМ Трис-НСl, pH 8.3, 50 мМ KCl, 0.2 мМ dNTPs, 1.6 мМ Mg<sup>2+</sup>, 250 нМ каждого праймера, 2 ед. *Taq* ДНК-полимеразы (для низкомолекулярных фрагментов — 1841 п. н. и ниже), 2 ед. *Taq*-полимеразы и 0.4 ед. *Pfu*-полимеразы (для высокомолекулярных фрагментов — больше чем 1841 п. н.). Амплификацию фрагментов проводили с праймерами, указанными в таблице. Амплификацию ДНК, выделенной из цитозольной фракции, проводили при 40 циклах, из митохондриальной фракции — при 28 циклах. Визуализацию полученных фрагментов осуществляли при электрофоретическом разделении в 1%-ном агарозном геле в буферном растворе, содержащем 10 мМ Трис-ацетат и 1 мМ ЭДТА. Гель окрашивали бромистым этидием и фотографировали.

ПЦР в реальном времени проводили на амплификаторе MX3000 (Stratagene). Для регистрации количества мтДНК использовали дуплексную систему амплификации с одновременной регистрацией флуоресценции

по двум длинам волн. Реакцию проводили с использованием описанных выше реагентов. Праймеры и зонды, использованные для количественного определения мтДНК, указаны в таблице.

Исследование нуклеазной активности цитозолей головного мозга и селезенки. Реакцию проводили в объеме 50 мкл. В среду, содержащую 10 мМ Трис-НСl, pH 7.5, 1 мМ Mg<sup>2+</sup> и 2 мМ Са<sup>2+</sup>, добавляли 2 мкг высокомолекулярной ДНК тимуса телят и цитозольную фракцию мозга (50 мкг белка) и инкубировали при 37° С в течение 24 ч. После хлороформного разделения и осаждения в спирте образцы разделяли электрофоретически в 2%-ной агарозе в ТАЕ-буферном растворе. Гель окрашивали бромистым этидием и фотографировали.

## Результаты

Для исследования выхода ДНК из митохондрий необходимо было оценить методические возможности, поскольку предстояло анализировать единичные копии мтДНК в цитозольной фракции клеток. Естественно, что при выделении митохондрий в процессе гомогенизации и центрифугирования часть клеточных органелл подвергается механическому разрушению. Разрушенные структуры и макромолекулы могут прилипать к митохондриям, а главное, создавать искусственный пул молекул в цитозоле. Вследствие этого были проведены эксперименты по установлению фонового уровня митохондриальной и ядерной ДНК, присутствующего в цитозольной фракции клеток мозга контрольных мышей.

На рис. 1 представлено электрофоретическое разделение фрагментов ДНК гена *gapdh* из цитозольной фракции мозга и из гомогената ткани мозга. Тотальную ДНК из клеток мозга выделяли методом фенол-хлороформного разделения с последующим осаждением спиртом. Проводилось последовательное разведение количества тотальной ДНК в ПЦР от 100 нг до 1 фг. Слабая полоска амплифицированного фрагмента гена *gapdh* присутствовала при разведении тотальной ДНК до 1 фг. Использовать этот же метод выделения ДНК из цитозольной фракции не представлялось возможным из-за низкого содержания ДНК. Метод сорбции на магнитных сорбентах позволил выделить ДНК из растворов с чрезвычайно низким содержанием ДНК, но было невозможно определить ее концентрацию. В связи с этим количественной характеристикой образца ДНК могло служить последо-

вательное порядковое разведение препарата ДНК. На рис. 1 видно, что при внесении 2 мкл ДНК, выделенной из цитозоля, в ПЦР на электрофореграмме регистрируется полоса амплификации фрагмента (рис. 1, дорожка 2). При разведении этого образца в 10 раз полоса практически пропадает (рис. 1, дорожка 3). Это коррелирует с 10 и 1 фг тотальной ДНК соответственно (рис. 1, дорожки 8, 9). Аналогичным образом мы зарегистрировали следовые количества мтДНК. Таким образом, мы сделали вывод о том, что описываемые методические подходы могут быть использованы для исследования проблемы мтДНК из митохондрий.

При амплификации мтДНК цитозольной фракции клеток мозга и селезенки контрольных мышей обнаружены фрагменты мтДНК размером от 100 до 2000 п.н. с использованием праймеров, указанных в таблице. На рис. 2 представлен фрагмент мтДНК размером 1841 п.н. Можно видеть, что в клетках мозга через 5, 24—48 и 72 ч после облучения наблюдается заметное увеличение фрагментов (рис. 2, а). Фрагмент мтДНК размером 10 090 п.н. у контрольных мышей отсутствует (рис. 2, в, дорожка 5), тогда как через 5 ч после облучения фрагмент отчетливо регистрируется. Более того, в цитозоле облученных в дозе 5 Гр мышей фрагменты мтДНК размером 10 090 п.н. сохраняются в течение всего срока наблюдения, вплоть до 1 нед (рис. 2, в, дорожки 6—10). Можно было бы предположить, что ИР нарушает структуру митохондрий, вследствие чего в процессе выделения они более подвержены разрушению. Однако результаты исследований по измерению активности матричного фермента митохондрий — цитратсинтазы — в цитозольной фракции клеток мозга свидетельствуют о том, что ИР в дозе 5 Гр не вызывает повреждений митохондрий в большей степени, чем в контроле (Patrushev et al., 2006).

У контрольных мышей в цитозоле спленоцитов также регистрируется некий уровень фрагментов митохондриальной ДНК размером до 2000 п.н. Как и в цитозоле клеток мозга, в цитозоле клеток селезенки через 5 ч после облучения в дозе 5 Гр количество фрагментов мтДНК размером 1841 п.н. увеличено (рис. 2, б, дорожка 2). В более поздние сроки после облучения уровень амплифицированных фрагментов либо возвращается к контрольному, либо снижается ниже контроля (рис. 2, б, дорожки 3, 4). Амплификацию фрагментов мтДНК размером 10 090 п.н. не удалось получить в цитозоле клеток селезенки ни у контрольных, ни у облученных мышей (рис. 2, в). Мы полагаем, что в селезенке, как и в мозге,

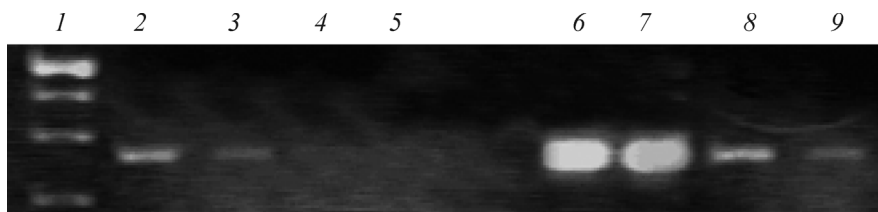


Рис. 1. Амплификация фрагмента гена *gapdh* цитозольной фракции и тотальной ДНК клеток мозга контрольных мышей. Дорожки: 1 — маркер, 2 — 2 мкл, 3 — 0.2 мкл, 4 — 0.02 мкл цитозольной фракции в ПЦР, 5 — отрицательный контроль ПЦР, 6 — 1 пг, 7 — 100 фг, 8 — 10 фг, 9 — 1 фг тотальной ДНК.

Fig. 1. Amplification of *gapdh* gene fragment. Isolation of DNA from a cytosol fraction and from a homogenate of brain tissue of non-irradiated mice (control group).

1 — DNA weight marker, 2 — 2 μl, 3 — 0.2 μl, 4 — 0.02 μl of DNA a cytosol fraction in PCR reaction, 5 — negative control of PCR, 6 — 1 pg, 7 — 100 fg, 8 — 10 fg, 9 — 1 fg of total DNA.

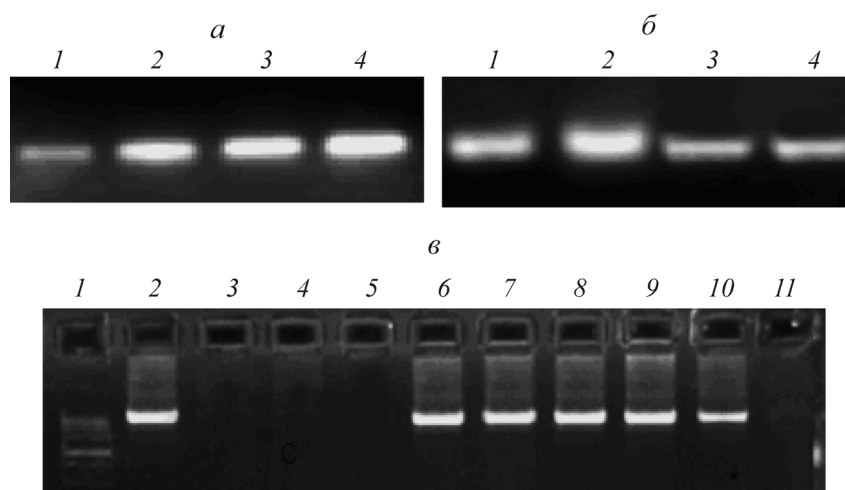


Рис. 2. Амплификация фрагментов мтДНК цитозоля клеток мозга и селезенки контрольных и облученных в дозе 5 Гр мышей. *а, б* — фрагмент 1841 п. н.; *в* — фрагмент 10 090 п. н. *а, б*: 1 — контроль, 2 — 5 ч, 3 — 24/48 ч, 4 — 1 нед после облучения. *в*: 1 — маркер, 2—4 — мтДНК клеток селезенки. 2 — митохондрии контрольных мышей, 3 — цитозоль контрольных мышей, 4 — цитозоль облученных мышей. 5—10 — мтДНК клеток мозга. 5 — цитозоль контрольных мышей, 6 — 5 ч, 7 — 24 ч, 8 — 48 ч, 9 — 72 ч, 10 — 1 нед после облучения, 11 — контроль ПЦР.

Fig. 2. Amplification of mtDNA fragments located in the cytosol of brain and spleen cells of irradiated (5 Gy) and non-irradiated mice. *а, б* — 1841 b.p. fragment; *в* — 10 090 b.p. fragment. *а, б*: 1 — control mice, 2 — 5 h, 3 — 24/48 h, 4 — 1 week after irradiation. *в*: 1 — DNA weight marker, 2—4 — spleen mtDNA. 2 — DNA isolated from spleen of non-irradiated mice, 3 — DNA isolated from the cytosol spleen cells of non-irradiated mice, 4 — the cytosol of spleen cells of mice after irradiation. 5—10 — mtDNA isolated from brain cells. 5 — DNA isolated from the cytosol of brain cells of non-irradiated mice, 6 — 5 h, 7 — 24 h, 8 — 48 h, 9 — 72 h, 10 — 1 week after irradiation, 11 — negative control of PCR.

в ответ на облучение происходит выход фрагментов мтДНК в цитозоль клеток. Однако уровень эндонуклеазной активности в спленоцитах, индуцированной облучением, настолько высок, что не позволяет сохраниться в цитозоле фрагментам размером 10 090 п. н., и даже фрагменты 1841 п. н. подвергаются деградации. Именно этим объясняется снижение уровня амплификации фрагмента 1841 п. н. через 24 ч и 72 ч после облучения в селезенке. Для проверки этого предположения мы проанализировали ДНК-деградирующую способность цитозольных фракций клеток мозга и селезенки мышей.

На рис. 3 представлена нуклеазная активность цитозольных фракций клеток мозга и селезенки контрольных и облученных в дозе 5 Гр мышей. Инкубация в течение 1 сут высокомолекулярной ДНК с белками цитозольной фракции спленоцитов приводит к полной деградации ДНК. Межнуклеосомная фрагментация ДНК в спленоцитах после облучения млекопитающих в летальных дозах хорошо известна. В полном соответствии с имеющимися представлениями мы наблюдали гибель клеток селезенки по типу апоптоза. Нужно отметить, что нуклеазной активностью обладает и цитозольная фракция клеток

мозга (рис. 3), однако она значительно менее выражена и либо недостаточна для деградации больших фрагментов мтДНК мозга, либо не имеет специфичности, либо фрагменты мтДНК ассоциированы с белками, защищающими от действия нуклеаз. Появление фрагментов мтДНК в цитозоле клеток мозга и селезенки при облучении мышей в летальных дозах можно было бы объяснить нарушением целостности органеллы. Однако, как следует из

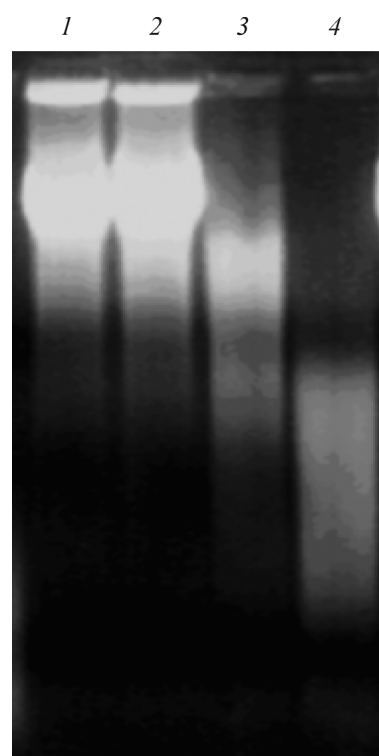


Рис. 3. Электрофореграммы ДНК тимуса теленка после ее инкубации с фракциями цитозоля из клеток головного мозга и селезенки облученных мышей.

Фракции цитозоля получали из тканей животных через 24 ч после их облучения в дозе 5 Гр. 1, 3 — фракции цитозоля из головного мозга: 1 — +3 мМ ЭДТА, 3 — без ЭДТА. 2, 4 — фракции цитозоля из селезенки: 2 — +3 мМ ЭДТА, 4 — без ЭДТА.

Fig. 3. Electrophoresis of calf thymus DNA after incubation with cytosol fractions of brain and spleen cells of irradiated mice.

Fractions of cytosol were purified were purified in 24 h after irradiation (5 Gy). 1, 3 — brain cytosol: 1 — 3 mM EDTA free, 3 — without EDTA. 2, 4 — spleen cytosol: 2 — 3 mM EDTA free, 4 — without EDTA.

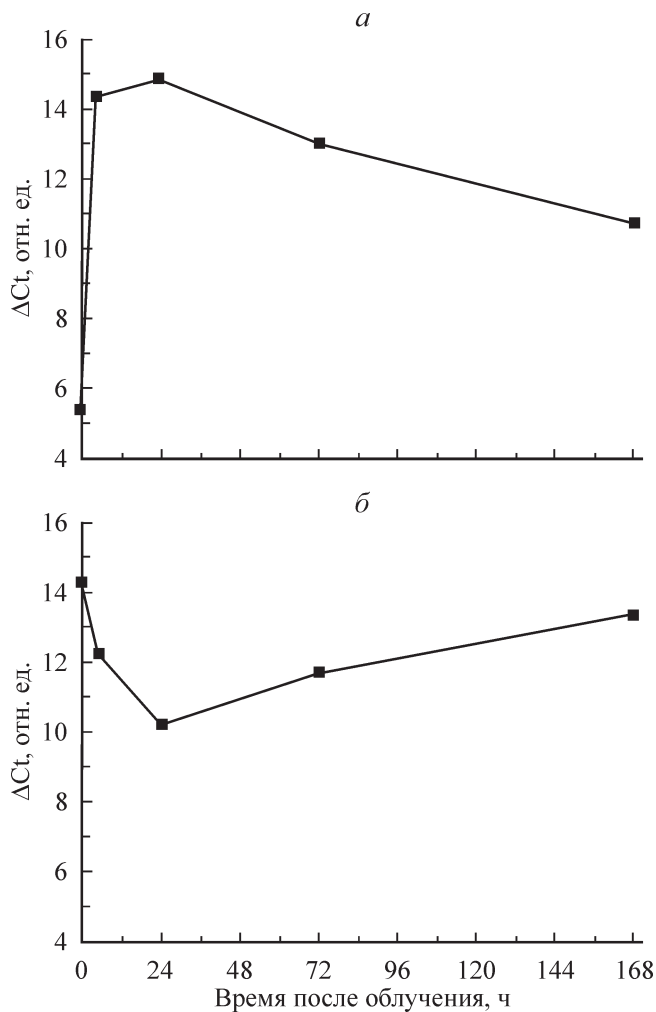


Рис. 4. Динамика изменения количества копий мтДНК в митохондриях клеток головного мозга (а) и селезенки (б) при облучении мышей в дозе 5 Гр.

Параметр  $\Delta Ct$  рассчитывается по формуле  $\Delta Ct = Ct_{gapdh} - Ct_{mtDNA}$ , где  $Ct$  — цикл ПЦР, при котором начинается экспоненциальная стадия кинетики реакции ( $Ct$  прямо пропорционален количеству ДНК).  $\Delta Ct = 2.5$  при превышении фрагмента мтДНК над *gapdh* в 10 раз.

Fig. 4. Dynamics of changes in the number of mtDNA copies in brain (a) and spleen (b) mitochondrial matrix after irradiation (5 Gy).

$Ct$  — difference between the beginning of exponential phases of mtDNA and beta-actin fragments amplification.

дальнейших экспериментов, этого не происходит. Нами была проведена количественная оценка динамики изменения количества копий мтДНК непосредственно в митохондриях. Количественная оценка осуществлялась методом ПЦР в реальном времени с использованием ДНК, выделенной непосредственно из митохондриальной фракции. Как видно на рис. 4, в митохондриях мозга происходит резкое увеличение количества копий мтДНК через 5 ч после облучения мышей в дозе 5 Гр. Повышенный уровень сохраняется в течение 1 сут, затем постепенно снижается в течение 1 нед, но все еще заметно превышает контрольные значения.

В селезенке облученных мышей количество копий мтДНК падает через 1 сут после облучения. В более поздние сроки количество копий приближается к конт-

рольному уровню (рис. 4). Это свидетельствует о том, что развивается компенсаторная реакция в ответ на массовую гибель спленоцитов.

## Обсуждение

Результаты наших исследований демонстрируют, что при облучении мышей в высоких дозах в цитозоле клеток появляются фрагменты мтДНК. Размер этих митохондриальных фрагментов в разных тканях варьирует от 2 до 10 тыс. п.н., что представляет собой существенную часть митохондриального генома.

Ранее нами было показано, что открытие митохондриальной циклоспорин-А-чувствительной поры (РТР) приводит к выходу фрагментов мтДНК из митохондрий размером от 0.3 до 2.0 тыс. пар оснований (Patrushev et al., 2004).

Полученные в настоящих экспериментах данные дают основание полагать, что появление фрагментов мтДНК в цитозоле клеток головного мозга и селезенки после облучения мышей является результатом нарушения функционирования митохондрий. Элиминируемые из митохондрий селезенки фрагменты ДНК не превышают 2000 п.н., поскольку подвергаются деградации в процессе апоптоза, так как ИР является эффективным индуктором программируемой гибели этих клеток (Nisoli et al., 2003; Kutsyi et al., 2005). В цитозоле клеток мозга облученных животных регистрируются фрагменты мтДНК размером более 10 000 п.н., которые сохраняются в течение длительного времени. Возможно, регистрируемые нами в цитозоле фрагменты образуют комплексы с белками или замыкаются в кольцо и поэтому менее подвержены эндо- и экзонуклеазной деградации. Ранее в ряде исследований было показано увеличение содержания внеклеточной мтДНК в сыворотке или плазме крови животных и человека при старении, у пациентов с опухолевой патологией, а также при стрессовых воздействиях (Katsumata et al., 1994; Midgley et al., 1995; Yoneda et al., 1995; Chiappini et al., 2004). Эти данные позволяют предполагать, что выбрасываемые из митохондрий в цитозоль фрагменты ДНК могут в конечном счете увеличивать их содержание в плазме крови и служить диагностическим маркером (Chiappini et al., 2004).

В наших экспериментах наряду с переходом мтДНК в цитозоль клеток селезенки облученных мышей мы обнаружили снижение копий мтДНК в митохондриальной фракции в 1-е сут после облучения. Снижение копий мтДНК в клетках тканей человека и животных является критическим событием, с которым связаны возникновение митохондриальной дисфункции и развитие различных патологий (Lallev et al., 1993; Pava, 1996; Chung et al., 2001). В пострадиационный период после резкого снижения происходит постепенное восстановление количества копий, что обусловлено активацией репликации сохранившихся копий мтДНК в митохондриях. Как известно, мтДНК может реплицироваться независимо от пролиферативной активности клеток и от репликации яДНК. В то время как синтез яДНК в клетках млекопитающих протекает в ограниченный период клеточного цикла, в S-фазе, синтез мтДНК происходит во всех фазах клеточного цикла (Wong, Boles, 2005). При повреждении яДНК в клетке ее репликация блокируется индуцибельной системой контроля развития клеточного цикла до завершения репарации (Shadel, Clayton, 1997). Однако, как

указывают многие данные, репликация поврежденной мтДНК в клетках явно блокируется, хотя частота повреждений в ней может быть выше по сравнению с яДНК (Chang, Looney, 1966; Pava, 1999; May, Bohr, 2000; Газиев, Подлукций, 2003).

Уязвимость молекул мтДНК для повреждающих агентов зависит от их структурно-функциональной организации и компактности укладки, как и в случае яДНК (Zhou, Elledge, 2000). Как известно, каждая митохондрия в клетках млекопитающих содержит 2—10 копий мтДНК, которые могут быть собраны в виде нуклеотидов и связываются с белками внутренней мембраны органеллы (Smerdon, Conconi, 1999; Bogenhagen et al., 2003; Iborra et al., 2004). В митохондриях выявлено множество белков, в том числе гистоноподобных, способных образовывать комплексы с мтДНК (Kaufman et al., 2000; Kutsyi et al., 2005). Хотя эти белки не образуют нуклеосомных структур с мтДНК, они могут обеспечивать компактную укладку митохондриального генома и его защиту от действия АФК. Поэтому, надо полагать, больше всего повреждаются в облученных клетках транскрибируемые или менее компактизированные копии мтДНК. Наблюдаемое нами увеличение количества копий мтДНК в пострадиационный период в мозге, скорее всего, связано с активацией амплификации неповрежденных или малоповрежденных молекул мтДНК, которые находились в момент радиационного воздействия в составе ДНК-белковых комплексов, обеспечивающих им защиту от действия свободных радикалов. Сигнальные механизмы индукции амплификации мтДНК и биогенеза митохондрий в клетках после воздействия повреждающих факторов в настоящее время недостаточно выяснены (Scarpulla, 2002; Zong et al., 2002; Kutsyi et al., 2005). Активация этих процессов в клетках тканей человека и животных после воздействия ДНК-повреждающих агентов или окислительного стресса рассматривается как компенсаторная реакция этих клеток, связанная с возникновением дефицита энергии в них в результате повреждения мтДНК или закрепления в ней мутации (Lee et al., 2000; Wei et al., 2001; Yen et al., 2002; Nisoli et al., 2003; Carew et al., 2004; Kamal, French, 2004). Наблюдаемое нами увеличение копии мтДНК в мозге облученных мышей, возможно, связано также с возникновением дефицита АТФ в клетках этих тканей в результате повреждения части копий мтДНК. Кроме того, хорошо известна чрезмерная активация реакции полиАДФ-рибозилирования ядерных белков в клетках, облученных ИР. Для такой модификации белков требуется NAD, на образование которого расходуется значительное количество АТФ (Kutsyi et al., 2005). Очевидно, для компенсации возникшего дефицита энергии в тканях облученных животных возникает необходимость увеличения количества копий мтДНК и биогенеза митохондрий. Так, продемонстрировано, что окись азота является эффективным индуктором биогенеза митохондрий в разнообразных клетках и, возможно, оказывает влияние на регуляцию энергетического баланса в организме (Nisoli et al., 2003; Carew, 2004). Увеличение количества копий мтДНК и митохондриальной массы наблюдается в клетках после действия химических окислителей и в связи с возникновением митохондриальной дисфункции в тканях в процессе терапии вирусных патологий (Lee et al., 2000; Wei, 2001; Kamal, French, 2004). Повышенный уровень копий мтДНК выявляется при наследуемых митохондриальных патологиях, связанных с мутациями и делециями мтДНК (D'Amours

et al., 1999; Wei et al., 2001; Scarpulla, 2002; Wredenberg et al., 2002; Yen et al., 2002; Zong et al., 2002; Bai et al., 2004).

Таким образом, в результате повреждения и элиминации части копий мтДНК в митохондриях происходит активация репликации менее поврежденных или нерепарированных молекул мтДНК. Наблюдаемую активацию синтеза мтДНК в клетках тканей облученных животных можно рассматривать как развитие компенсаторной реакции в связи с возникновением дефицита энергии в результате расхода АТФ и структурных изменений в генах, контролирующих окислительное фосфорилирование. Можно также предположить, что при низкой эффективности функционирования систем репарации в митохондриях важнейшим механизмом сохранения митохондриального генома в условиях его постоянного повреждения эндогенными АФК, при воздействии ИР и других экзогенных агентов является амплификация неповрежденных или малоповрежденных копий мтДНК.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект р-04-04-97278).

#### Список литературы

- Газиев А. И., Подлукций А. Я. 2003. Низкая эффективность систем репарации в митохондриях. Цитология. 45 (4) : 403—417.
- Bai R. K., Perng C. L., Hsu C. H., Wong L. J. 2004. Quantitative PCR analysis of mitochondrial DNA content in patients with mitochondrial disease. Ann. N. Y. Acad. Sci. 1011 : 304—309.
- Baugnet-Mahieu L., Goutier R., Baes C. 1970. Comparative sensitivity of the nuclear and mitochondrial DNA synthesis to X-irradiation and to the administration of a sulfhydryl radioprotection (AET) in normal and regenerating rat liver. Biophysik. 6 : 357—366.
- Bogenhagen D. F., Wang Y., Shen E. L., Kobayashi R. 2003. Protein components of mitochondrial DNA nucleoids in higher eukaryotes. Mol. Cell Proteomics. 2 : 1205—1216.
- Brustovetsky N., Dubinsky J. M. 2002. Dual responses of CNS mitochondria to elevated calcium. J. Neurosci. 20 : 103—113.
- Carew J. S., Nawrocki S. T., Xu R. H., Dunner K., McConkey D. J., Wierda W. G., Keating M. J., Huang P. 2004. Increased mitochondrial biogenesis in primary leukemia cells: the role of endogenous nitric oxide and impact on sensitivity to fludarabine. Leukemia. 18 : 1934—1940.
- Chang L. O., Looney W. B. 1966. Incorporation of tritiated thymidine into mitochondrial and nuclear DNA in normal and regenerating rat liver before and after irradiation. Int. J. Radiat. Biol. 12 : 187—192.
- Chiappini F., Teicher E., Saffroy R., Pham P., Falissard B., Barrier A., Chevalier S., Debuire B., Vittecoq D., Lemoine A. 2004. Prospective evaluation of blood concentration of mitochondrial DNA as a marker of toxicity in 157 consecutively recruited untreated of HAART-treated HIV-positive patients. Lab. Invest. 84 : 908—914.
- Chung H. C., Kim S. H., Lee M. C., Cho C. K., Kim T. H., Lee D. H., Kim S. S. 2001. Mitochondrial dysfunction by gamma-irradiation accompanies the induction of cytochrome P450 2E1 (CYP2E1) in rat liver. Toxicology. 161 : 79—91.
- Cleaver J. E. 1992. Replication of nuclear and mitochondrial DNA in X-ray-damaged cells: evidence for a nuclear-specific mechanism that down-regulates replication. Radiat. Res. 131 : 338—344.
- D'Amours D., Desnoyers S., D'Silva I., Poirier G. G. 1999. Poly(ADP-ribosylation) reactions in the regulation of nuclear functions. Biochem. J. 342 : 249—268.
- Dianov G. L., Souza-Pinto N., Nyaga S. G., Thybo T., Stevnsner T., Bohr V. A. 2001. Base excision repair in nuclear and mitochondrial DNA. Prog. Nucl. Acid Res. Mol. Biol. 68 : 285—297.
- Iborra F. J., Kimura H., Cook P. R. 2004. The functional organization of mitochondrial genomes in human cells. BMC Biol. 2 : 9.

- Kamal M. A., French S. W. 2004. Drug-induced increased mitochondrial biogenesis in a liver biopsy. *Exp. Mol. Pathol.* 77 : 201—204.
- Kang D., Hamasaki N. 2005. Alterations of mitochondrial DNA in common disease and disease states: aging, neurodegeneration, heart failure, diabetes, and cancer. *Curr. Med. Chem.* 12 : 429—441.
- Katsumata K., Hayakawa M., Tanaka M., Sugiyama S., Oza-wa T. 1994. Fragmentation of human heart mitochondrial DNA associated with premature aging. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 202 : 102—110.
- Kaufman B. A., Newman S. M., Hallberg R. L., Slaughter C. A., Perlman P. S., Butow R. A. 2000. In organello formaldehyde cross-linking of proteins to mtDNA: identification of bifunctional proteins. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 97 : 7772—7777.
- Kutsyi M. P., Gouliava N. A., Kuznetsova E. A., Gaziev A. I. 2005. DNA-binding proteins of mammalian mitochondria. *Mitochondrion.* 5 : 35—44.
- Lallev A., Anachkova B., Russev G. 1993. Effect of ionizing radiation and topoisomerase II inhibitors on DNA synthesis in mammalian cells. *Eur. J. Biochem.* 216 : 177—181.
- LeDoux S. P., Wilson G. L. 2001. Base excision repair of mitochondrial DNA damage in mammalian cells. *Prog. Nucl. Acid Res. Mol. Biol.* 68 : 273—284.
- Lee H. C., Yin P. H., Lu C. Y., Chi C. W., Wei Y. H. 2000. Increase of mitochondria and mitochondrial DNA in response to oxidative stress in human cells. *Biochem. J.* 348 (Pt 2) : 425—432.
- May A., Bohr V. A. 2000. Gene-specific repair of gamma-ray-induced DNA strand breaks in colon cancer cells: no coupling to transcription and no removal from the mitochondrial genome. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 269 : 433—437.
- Midgley C., Owens B., Briscoe C. V., Thomas D. B., Lane D. P., Hail P. A. 1995. Coupling between gamma irradiation, P53 induction and the apoptosis response depends upon cell type *in vivo*. *J. Cell Sci.* 108 : 1843—1848.
- Nisoli E., Clementi E., Paolucci C., Cozzi V., Tonello C., Sciorati C., Bracale R., Valerio A., Francolini M., Moncada S., Carruba M. O. 2003. Mitochondrial biogenesis in mammals: the role of endogenous nitric oxide. *Science.* 299 : 896—899.
- Ogawa Y., Kobayashi T., Nishioka A., Kariya S., Hamasato S., Seguchi H., Yoshida S. 2003. Radiation-induced reactive oxygen species formation prior to oxidative DNA damage in human peripheral T cells. *Int. J. Mol. Med.* 11 : 149—152.
- Papa S. 1996. Mitochondrial oxidative phosphorylation changes in the rat life span. Molecular aspects and physiopathological implications. *Biochim. biophys. acta.* 1276 : 87—105.
- Papa S. 1999. Mitochondrial mutagenesis in human cells and tissues. *Mutat. Res.* 434 : 177—203.
- Patrushev M., Kasumov V., Patrusheva V., Ushakova E., Gogvadze V., Gaziev A. 2004. Mitochondrial permeability transition triggers the release of mtDNA fragments. *Cell. Mol. Life Sci.* 61 : 3100—3103.
- Patrushev M., Kasumov V., Patrusheva V., Ushakova E., Gogvadze V., Gaziev A. 2006. Release of mitochondrial DNA fragments from brain mitochondria of irradiated mice. *Mitochondrion.* (In press).
- Scarpulla R. C. 2002. Nuclear activators and coactivators in mammalian mitochondrial biogenesis. *Biochim. biophys. acta.* 1576 : 1—14.
- Shadel G. S., Clayton D. A. 1997. Mitochondrial DNA maintenance in vertebrates. *Annu. Rev. Biochem.* 66 : 409—435.
- Smerdon M. J., Conconi N. L. 1999. Modulation of DNA damage and repair in chromatin. *Prog. Nucl. Acids. Res. Mol. Biol.* 62 : 227—255.
- Takeuchi H., Fujimoto A., Hoon D. S. 2004. Detection of mitochondrial DNA alterations in plasma of malignant melanoma patients. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1022 : 50—54.
- Wallace D. C. 2001. A mitochondrial paradigm for degenerative diseases and ageing. *Novartis Found Symp.* 235 : 247—266.
- Wei Y. H., Lee C. F., Lee H. C. 2001. Increases of mitochondrial mass and mitochondrial genome in association with enhanced oxidative stress in human cells harboring 4977 bp-deleted mitochondrial DNA. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 928 : 97—112.
- Wong L. J., Boles R. G. 2005. Mitochondrial DNA analysis in clinical laboratory diagnostics. *Clin. chim. acta.* 354 : 1—20.
- Wredenberg A., Wilbom R., Wilhelmsson H., Graff C., Wiener H. H., Burden S. J., Oldfors A., Westerblad H., Larsson N.-G. 2002. Increased mitochondrial mass in mitochondrial myopathy mice. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 99 : 15 066—15 071.
- Yen M. Y., Chen C. S., Wang A. G., Wei Y. H. 2002. Increase of mitochondrial DNA in blood cells of patients with Leber's hereditary optic neuropathy with 11 778 mutation. *Br. J. Ophthalmol.* 86 : 1027—1030.
- Yoneda M., Katsumata K., Hayakawa M., Tanaka M., Oza-wa T. 1995. Oxygen stress induces an apoptotic cell death associated with fragmentation of mitochondrial genome. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 209 : 723—729.
- Zhou B. S., Elledge S. J. 2000. The DNA damage response: putting checkpoints in perspective. *Nature.* 408 : 433—439.
- Zong H., Ren J. M., Young L. H., Pypaert M., Mu J., Brimbaum M. J., Shulman G. I. 2002. AMP kinase is required for mitochondrial biogenesis in skeletal muscle in response to chronic energy deprivation. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 99 : 15 983—15 987.

Поступила 30 V 2005

#### RELEASE OF mtDNA FROM MITOCHONDRIA AND ACTIVATION OF ITS REPLICATION IN TISSUES OF IRRADIATED MICE

M. V. Patrushev, V. E. Patrusheva, V. A. Kasymov, E. V. Evdokimovsky, T. E. Ushakova, A. I. Gaziev

Institute of Theoretical and Experimental Biophysics RAS, Pushchino;  
e-mail: patrushevmaxim@rambler.ru

A necessary condition for normal functioning of mitochondria is the maintenance of certain numbers of intact mtDNA molecules. In the present study, we investigated changes in the number of mtDNA copies in brain and spleen cells of mice subjected to irradiation. For the first time, we observed the irradiation-induced output of mtDNA fragments into brain and spleen cell cytosol. In the cytosol of these cells, examined in mice 5 h after 5 Gy irradiation, 1841 h.p. mtDNA fragments were detected able to persist for at 3 weeks. In addition, larger fragments of mtDNA (10 090 b.p.) were detected in the cytosol of brain cells of irradiated mice. The occurrence of mtDNA fragments in the cytosol of brain cells is accompanied with an increase in the number of mtDNA copies in the mitochondrial matrix. The induction of mtDNA replication in brain cells of irradiated animals may be considered as a compensatory reaction in response to mtDNA damage. A sharp decrease in the amount of mtDNA copies in the mitochondrial matrix of spleen cells on the first day after irradiation may be considered as apoptosis development. However, the compensatory reaction in brain cells was also noticed but in later terms.