

## ВЛИЯНИЕ ДЕФИЦИТА АУТОКРИННЫХ ФАКТОРОВ В КУЛЬТУРЕ НА ВЫЖИВАНИЕ И ЭНЕРГЕТИЧЕСКИЙ МЕТАБОЛИЗМ КЛЕТОК ЛИНИИ СТLL-2 В УСЛОВИЯХ ОКИСЛИТЕЛЬНОГО СТРЕССА

© Г. В. Луценко, М. В. Гречихина, Л. Г. Дьячкова, Н. И. Луцан

*Институт биоорганической химии им. академиков М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова РАН, Москва; электронный адрес: gvlut@mail.ibch.ru*

Появляется все больше данных, свидетельствующих о том, что выживание клеток млекопитающих находится под контролем факторов роста и аутокринных факторов (АФ) выживания. Мы исследовали влияние дефицита АФ на выживание, внутриклеточное содержание АТФ и трансмембранный потенциал митохондрий клеток ИЛ-2-зависимой линии СТLL-2 при окислительном стрессе. Было показано, что клетки, культивируемые в условиях дефицита АФ, становятся более чувствительными к окислительному стрессу по сравнению с клетками СТLL-2, которые культивируются в отсутствие дефицита АФ (контроль), и их гибель наступает при меньших концентрациях  $H_2O_2$ , чем в случае контрольных клеток. Содержание АТФ в клетках СТLL-2 было снижено при дефиците АФ даже в отсутствие какого-либо стресса, и обработка клеток пероксидом водорода приводила к дополнительному значительному его снижению, что сопровождалось нарушениями клеточной мембраны (блеббинг) и резким падением потенциала митохондрий. Показано, что клеточная смерть при окислительном стрессе в условиях дефицита АФ протекает как по пути апоптоза, так и по пути некроза.

**Ключевые слова:** окислительный стресс, аутокринные факторы, АТФ, потенциал митохондрий, апоптоз, некроз.

**Принятые сокращения:** АФ — аутокринные факторы, ИЛ — интерлейкин, МТП — митохондриальный трансмембранный потенциал, ФИТЦ — флуоресцеинизотиоцианат, СССР — карбонилцианид-*m*-хлорфенилгидразон, МТТ — 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолийбромид.

В многоклеточном организме выживание клеток находится под контролем множества цитокинов различной природы. Такой контроль необходим для поддержания гомеостаза тканей, который достигается за счет баланса между скоростями клеточной пролиферации и клеточной гибели. Установлено, что ИЛ-3 способствует выживанию клеток гемопоэтической линии (Vander Heiden et al., 2001), фактор стволовых клеток помогает выживанию клеток стромальной линии (Huss et al., 1995), а ИЛ-4, ИЛ-6 и ИЛ-7 значительно продлевают время жизни покоящихся Т-лимфоцитов в культуре *in vitro* (Teague et al., 1997; Vella et al., 1997; Rathmell et al., 2001). Кроме того, ИЛ-2, ИЛ-4, ИЛ-7 и ИЛ-15, а также интерферон- $\alpha$  и интерферон- $\beta$  полностью предотвращают гибель активированных Т-клеток *in vitro* (Matzinger, 1994; Marrack et al., 1998).

Наряду с данными об участии в контроле клеточного выживания паракринных факторов, т. е. факторов, которые клетка получает от клеток других типов, имеются данные, указывающие на то, что контроль выживания клеток могут осуществлять также аутокринные факторы (АФ), т. е. факторы, продуцируемые клетками того же типа (Ishizaki et al., 1993, 1994; Луценко и др., 2001). В настоящее время ни природа таких аутокринных факторов выживания, ни механизмы их действия практически не изучены.

Ранее нами была разработана экспериментальная модель, позволяющая создавать искусственный дефицит АФ в культуре и исследовать последствия такого дефицита для выживания и метаболизма культивируемых клеток (Луценко и др., 2001). Эта модель, использованная для оценки влияния АФ на выживание клеток цитотоксической ИЛ-2-зависимой линии СТLL-2, включала в себя предварительное культивирование клеток СТLL-2 в культурах высокой плотности, их перенос в культуры низкой плотности и последующее культивирование в таких условиях. Основой для такой экспериментальной модели послужило явление, называемое клеточной десенситизацией и заключающееся в том, что при длительном воздействии какого-либо фактора на клетки их первоначальная чувствительность к этому фактору постепенно снижается (Албертс и др., 1994). В процессе культивирования клеток СТLL-2 в культуре высокой плотности (в условиях повышенной концентрации АФ), по-видимому, происходит снижение их чувствительности к АФ и перенос таких клеток вместе со свежей средой в культуру низкой плотности, где АФ практически отсутствуют, приводит к тому, что они начинают испытывать острую нехватку АФ (при избытке ИЛ-2 в среде). Недавно мы показали, что дефицит АФ в культуре приводит к временному нарушению энергетического метаболизма клеток. Это нарушение проявлялось в том, что

содержание АТФ в клетках СТЛЛ-2 многократно снижалось в течение 1—2 мин, достигая 10—20 % от исходного уровня, а затем постепенно восстанавливалось до нормальных значений в течение 2—4 ч. В то же время добавление в культуру низкой плотности кондиционированной среды, полученной из культур высокой плотности клеток СТЛЛ-2 и содержащей АФ в достаточной концентрации, препятствовало снижению уровня АТФ в клетках, что можно объяснить экзогенным восполнением дефицита АФ в культуре (Луценко, Дьячкова, 2003).

Известно, что само по себе падение содержания АТФ в клетках некоторых линий, вызванное, например, гипоксией и энергетическим голоданием, не всегда сопровождается их гибелью. Однако при дополнительных стрессовых воздействиях, например гипертермии, падение уровня внутриклеточного АТФ приводит к массовой гибели клеток (Gerweck, 1985). Аналогичные данные были получены нами недавно для гипотермического стресса (Луценко, Дьячкова, 2003). Мы показали, что временное снижение уровня АТФ в клетках СТЛЛ-2, вызванное дефицитом АФ в культуре, само по себе не приводит к гибели клеток, однако даже кратковременная гипотермия (0 °С, 10 мин) вызывает массовую гибель клеток в этих условиях.

Особое место в ряду стрессовых воздействий на клетку занимает окислительный стресс, поскольку многие химические и физические факторы опосредуют свое действие именно через окислительный стресс. В настоящее время окислительный стресс рассматривается в качестве медиатора апоптоза, принимающего самое непосредственное участие в механизме запуска этого процесса в клетке (Buttke, Sandstrom, 1994). Более того, недавно было показано, что пероксид водорода, образуемый внутри митохондрий, участвует в передаче апоптотного сигнала от клетки к клетке (Плетюшкина и др., 2006).

Поэтому в настоящей работе предстояло выяснить, как в условиях окислительного стресса наличие дефицита АФ в культуре скажется на состоянии энергетического метаболизма и выживании клеток СТЛЛ-2. Мы показали, что в процессе окислительного стресса клеток СТЛЛ-2 в условиях дефицита АФ в культуре наблюдается снижение уровня внутриклеточного АТФ до крайне низких значений, что приводит к отягощению клеточного стресса и проявляется в усилении блеббинга клеточной поверхности, падении трансмембранного потенциала митохондрий и ускорении гибели клеток по пути апоптоза или некроза.

## Материал и методика

Клетки и среды. Клетки ИЛ-2-зависимой линии СТЛЛ-2 выращивали в среде RPMI-1640 (Sigma, США) с добавлением 10 % эмбриональной телячьей сыворотки, 2 мМ L-глутамин (Sigma), 50 мкМ 2-меркаптоэтанола (Serva, Германия), 50 мкг/мл гентамицина и 50—100 Ед/мл рекомбинантного ИЛ-2 («Биотех», Санкт-Петербург). Клетки культивировали в 1 мл среды в 24-луночных планшетах (Costar, США) при 37 °С в атмосфере с 5 % CO<sub>2</sub>. При проведении экспериментов использовали культуральную среду (рН 7.2—7.4) с добавлением 5 % сыворотки и 100 Ед/мл рекомбинантного ИЛ-2.

Культуры высокой и низкой плотности. Дефицит АФ в культурах получали путем переноса клеток

из культур высокой плотности в культуры низкой плотности. В качестве культуры высокой плотности использовали так называемую pellet-культуру (Solursh, 1991) с некоторой модификацией. Для культивирования использовали круглодонные культуральные пробирки объемом 10 мл (Nunc, Дания). Непосредственно перед началом культивирования в пробирку вносили 1 мл клеточной суспензии, содержащей  $1 \cdot 10^6$  клеток в культуральной среде. Затем клетки осаждали центрифугированием (200 g, 1 мин) и в таком плотном осадке их культивировали в течение 14—16 ч при 37 °С. По окончании первого этапа культивирования клетки переносили в культуры низкой плотности. Для этого клетки собирали, отмывали и переносили в 100 мкл свежей среды в лунки плоскодонного 96-луночного планшета (Nunc) или в 1 мл в лунки 24-луночного планшета и культивировали при клеточной плотности  $1 \cdot 10^5$ — $2 \cdot 10^5$  клеток/мл с добавлением или без добавления H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. После завершения культивирования клетки отмывали средой RPMI-1640. В ряде экспериментов вместо свежей среды с клетками вносили кондиционированную среду из культур высокой плотности. Кондиционированную среду получали в виде надосадочной жидкости культур клеток СТЛЛ-2, культивируемых в концентрации  $1 \cdot 10^6$  клеток/мл в течение 24 ч.

Выживание клеток определяли с использованием МТТ-теста (Denizot, Lang, 1986) с некоторыми изменениями. Для проведения теста клетки осаждали в планшете центрифугированием (400 g, 5 мин) и стряхиванием удаляли надосадочную жидкость из лунок. После этого в лунки вносили по 30 мкл раствора МТТ (Sigma), приготовленного на среде RPMI-1640 (0.5 мг/мл), и инкубировали 2 ч при 37 °С в атмосфере с 5 % CO<sub>2</sub>. По истечении этого времени к содержимому каждой лунки добавляли по 100 мкл диметилсульфоксида и растворяли кристаллы формазана, образованного в результате восстановления МТТ живыми клетками. Измерение оптической плотности содержимого каждой лунки проводили на приборе Multiscan MCC/340 (Titertek, Великобритания) при длине волны 540 нм. Выживание клеток оценивали по величине оптической плотности раствора формазана в каждой пробе.

Определение доли клеток с блеббингом проводили с использованием камеры Горяева, просматривая 150—200 клеток. Учитывали клетки с одним большим пузырьком больше 1/2 диаметра клетки либо с несколькими пузырьками меньшего размера.

Содержание внутриклеточного АТФ определяли люциферин-люциферазным методом с использованием стандартного набора для определения АТФ (Sigma, США) на биOLUMинометре Triathler (Hidex, Финляндия).

Средний уровень внутриклеточного АТФ определяли в экспериментах по изучению кинетики содержания АТФ в опытных и контрольных клетках на протяжении окислительного стресса (рис. 3, б).

Средний уровень АТФ в клетках определяли по следующей формуле:

$$[\text{АТФ}] = \frac{1}{2} \Sigma ([\text{АТФ}_i] + [\text{АТФ}_{i+1}]) \cdot \Delta T_{i+1} / T,$$

где [АТФ] — средний уровень АТФ в клетках (нмоль/10<sup>6</sup> клеток),  $i = 0, 1, 2, 3$  — порядковый номер измерения, [АТФ<sub>*i*</sub>] — уровень АТФ при *i*-том измерении,  $\Delta T_{i+1}$  — интервал времени между измерениями *i* и (*i* + 1),  $T = \Sigma \Delta T_{i+1} = 4$  ч — общему времени опыта.

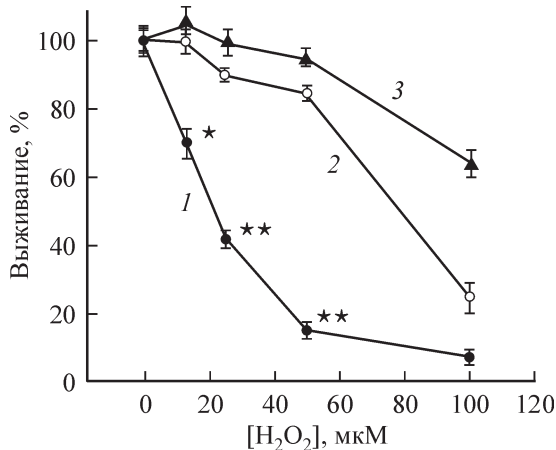


Рис. 1. Зависимость выживания клеток СТЛЛ-2 от концентрации  $H_2O_2$  при окислительном стрессе в условиях дефицита АФ.

Клетки СТЛЛ-2 из различных культур (см. ниже) переносили в культуры низкой плотности ( $2 \cdot 10^5$  клеток/мл) с добавлением  $H_2O_2$  в различных концентрациях, культивировали 3 ч, а затем оценивали их выживание с помощью МТТ-теста. 1 — дефицит АФ, клетки переносили из культур высокой плотности ( $1 \cdot 10^6$  клеток в плотном осадке) в свежей среде; 2 — контроль, клетки переносили из культур низкой плотности ( $2 \cdot 10^5$  клеток/мл) в свежей среде; 3 — клетки переносили из культур высокой плотности в кондиционированной среде. Все данные представлены в процентах от начальных уровней выживания. Различия между опытными и контрольными данными (кривые 1, 2) достоверны при уровнях значимости  $P < 0.01$  (\*) и  $P < 0.001$  (\*\*).

Трансмембранный потенциал митохондрий определяли с использованием метода проточной цитофлуориметрии. Для этого перед измерением клетки инкубировали при  $37^\circ C$  в течение 20 мин в среде RPMI-1640 с добавлением флуоресцентного зонда родамина 123 (Molecular Probes, США) в концентрации 1 мкг/мл, после чего дважды отмывали холодной средой. Измерения проводили на проточном цитофлуориметре

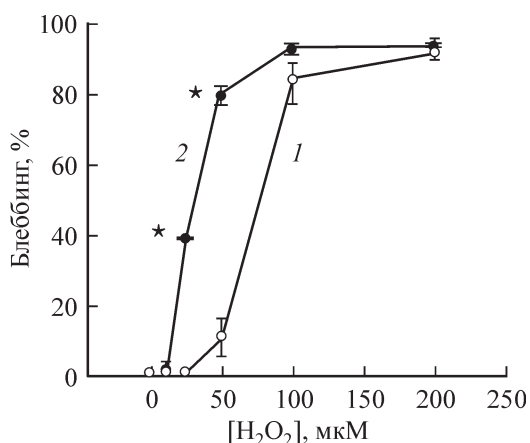


Рис. 2. Зависимость блеббинга клеток СТЛЛ-2 от концентрации  $H_2O_2$  при окислительном стрессе в условиях дефицита АФ.

Клетки СТЛЛ-2 из различных культур (см. ниже) переносили в свежей среде в культуры низкой плотности с добавлением  $H_2O_2$  в различных концентрациях, культивировали 3 ч, а затем определяли долю (в %) клеток с признаками блеббинга. 1 — контроль, клетки переносили из культур низкой плотности; 2 — дефицит АФ, клетки переносили из культур высокой плотности. Различия между опытными и контрольными данными достоверны при уровне значимости  $P < 0.01$  (\*).

FACScan (Becton Dickinson, США). В каждом образце анализировали не менее 10 000 клеток.

Регистрация апоптоза и некроза. Двойное окрашивание клеток аннексином V—ФИТЦ для регистрации фосфатидилсерина и йодидом пропидия для регистрации целостности клеток проводили, как это описано ранее (Vermees et al., 1995). После отмывки в фосфатном буфере  $2 \cdot 10^5$  клеток ресуспендировали в 100 мкл буфера (10 mM HEPES/NaOH, pH 7.4, 140 mM NaCl и 2.5 mM CaCl<sub>2</sub>) и добавляли 2.3 мкг/мл аннексина V—ФИТЦ (Sigma, США) и 10 мкг/мл йодида пропидия (Sigma, США), инкубировали в темноте при комнатной температуре 15 мин, а по истечении этого времени добавляли к суспензии 400 мкл указанного выше буфера и проводили измерение на проточном цитофлуориметре FACScan. В каждом образце анализировали не менее 10 000 клеток.

Статистическая обработка. Количество повторов для каждой экспериментальной точки составляло от 2 до 4. Все опыты были повторены не менее 3 раз. На всех графиках указаны средние значения и стандартные отклонения. Достоверность различия сравниваемых средних значений оценивали с помощью *t*-критерия Стьюдента.

## Результаты

Настоящую работу мы начали с исследования влияния дефицита АФ в культуре на выживание клеток СТЛЛ-2 в условиях окислительного стресса. Для этого клетки, полученные из культур высокой плотности, переносили в культуры низкой плотности вместе со свежей средой и пероксидом водорода в различных концентрациях, культивировали в этих условиях в течение 3 ч, а затем определяли их выживание с помощью МТТ-теста. В качестве контроля использовали клетки СТЛЛ-2, полученные из культур низкой плотности и перенесенные также в культуры низкой плотности. Кривые зависимости выживания исследуемых клеток от концентрации пероксида водорода приведены на рис. 1.

Представленные данные показывают, что дефицит АФ весьма значительно влияет на выживание клеток при окислительном стрессе. При культивировании в условиях дефицита АФ клетки оказывались более чувствительными к окислительному стрессу, чем клетки, не испытывающие недостатка в АФ (контроль), и погибали при меньших концентрациях пероксида водорода, чем последние (рис. 1, кривые 1, 2). Так, при концентрации  $H_2O_2$ , равной 50 мкМ, выживание контрольных клеток составляло 84.7%, в то время как выживание опытных клеток — лишь 14.7%. Внесение вместе с опытными клетками и пероксидом водорода не свежей среды, а кондиционированной среды, содержащей экзогенные АФ, приводило к повышению уровня выживания опытных клеток, так что в этом случае он превышал даже контрольный уровень (рис. 1, кривая 3).

Установлено, что одной из наиболее ранних реакций клетки на падение уровня внутриклеточного АТФ, вызванного гипоксией, служит блеббинг (появление пузырей на поверхности клетки) (Lemasters et al., 1987). Окислительный стресс также индуцирует блеббинг плазматической мембраны клетки (Bellomo et al., 1988; Габай и др., 1994). Мы проверили, как влияет дефицит АФ в культуре клеток СТЛЛ-2 на индукцию блеббинга при окисли-

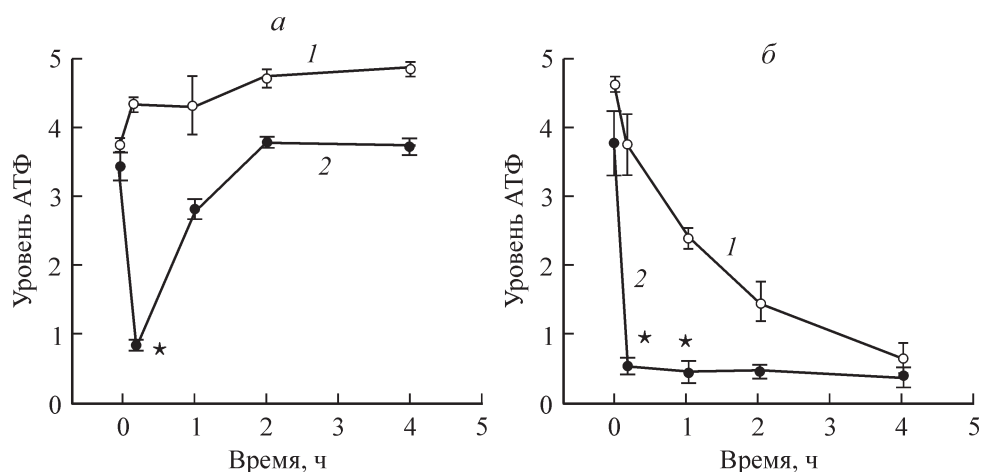


Рис. 3. Кинетика уровня АТФ в клетках СТЛЛ-2 при дефиците АФ в отсутствие  $H_2O_2$  (а) и в присутствии 50 мкМ  $H_2O_2$  (б). 1 — контроль, клетки переносили из культур низкой плотности в культуры низкой плотности; 2 — дефицит АФ, клетки переносили из культур высокой плотности в культуры низкой плотности. Уровень АТФ — в нмоль на  $10^6$  клеток. Различия между опытными и контрольными данными достоверны при уровне значимости  $P < 0.01$  (\*).

тельном стрессе этих клеток. Для этого опытные и контрольные клетки культивировали в течение 3 ч с добавлением пероксида водорода в различных концентрациях, после чего определяли в культурах процентное содержание клеток с признаками блеббинга. Появление клеток СТЛЛ-2 с признаками блеббинга в условиях окислительного стресса и дефицита АФ наблюдалось при более низких концентрациях  $H_2O_2$ , чем в случае, когда клетки не испытывали нехватки АФ. Так, если в культуре контрольных клеток при концентрации пероксида водорода 50 мкМ блеббинг составлял 10.5 % (рис. 2, кривая 1), то в культуре клеток с дефицитом АФ он достигал 79.9 % при той же концентрации  $H_2O_2$  (рис. 2, кривая 2). Наиболее вероятной причиной таких различий в индукции блеббинга между опытными и контрольными клетками является различное содержание АТФ в исследуемых клетках.

В следующей серии экспериментов мы провели сравнение кинетики уровня внутриклеточного АТФ при окислительном стрессе (50 мкМ  $H_2O_2$ ) контрольных клеток СТЛЛ-2 и клеток, испытывающих нехватку АФ. Ранее нами было показано, что при попадании клеток СТЛЛ-2 в условия дефицита АФ, даже в отсутствие каких-либо стрессовых воздействий, наблюдается резкое падение уровня внутриклеточного АТФ, которое сменяется постепенным его восстановлением до исходных значений (Луценко, Дьячкова, 2003) (рис. 3, а, кривая 2). В случае окислительного стресса таких клеток содержание АТФ в них после резкого падения не восстанавливалось, а продолжало сохраняться на уровне 8–11 % от исходного значения в течение всего времени культивирования (рис. 3, б, кривая 2). В то же время в случае окислительного стресса контрольных клеток наблюдалось плавное снижение внутриклеточного уровня АТФ (рис. 3, б, кривая 1), который ко 2-му ч культивирования составлял около 30 % начального уровня. Для получения количественной оценки различий между опытными и контрольными клетками мы подсчитали среднее содержание АТФ в контрольных и опытных клетках на протяжении всего времени окислительного стресса (см. раздел «Материал и методика»). Для контрольных и опытных клеток средние значения содержания АТФ составили

1.78 и 0.42 нмоль/ $10^6$  клеток соответственно, что составляет 38.7 и 11.3 % от начальных значений уровня АТФ в этих клетках до проведения окислительного стресса.

Значительные различия в содержании АТФ в опытных и контрольных клетках при их культивировании в условиях окислительного стресса побудили нас проверить, как дефицит АФ влияет на изменение митохондриального трансмембранного потенциала (МТП) клеток СТЛЛ-2, вызываемое окислительным стрессом. Регистрацию потенциала митохондрий мы проводили с помощью проточной цитофлуориметрии с использованием родамина 123 — липофильного катионного флуоресцентного красителя, проникновение которого через мембрану митохондрии коррелирует с величиной МТП (Shapiro, 2003). Деполяризация митохондрий клеток СТЛЛ-2 в присутствии СИССР — разобщителя окислительного фосфорилирования — свидетельствует о корректности применения данного метода (рис. 4). Кроме того, на рис. 4 видно, что интенсивность флуоресценции большинства клеток, обработанных 20 мкМ СИССР, не превышает 200 отн. ед. В последующих экспериментах интенсивность флуоресценции клеток менее 200 отн. ед. рассматривалась как свидетельствующая о деполяризации их митохондрий.

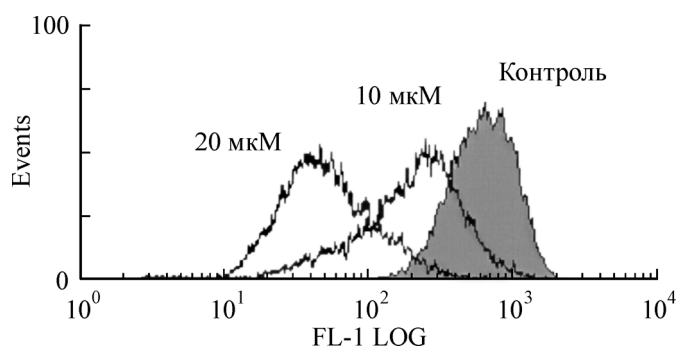


Рис. 4. Гистограммы интенсивности флуоресценции клеток СТЛЛ-2, окрашенных родамином 123, в присутствии СИССР. Концентрации СИССР указаны над соответствующими гистограммами. Приведены данные 1 из 3 репрезентативных экспериментов.

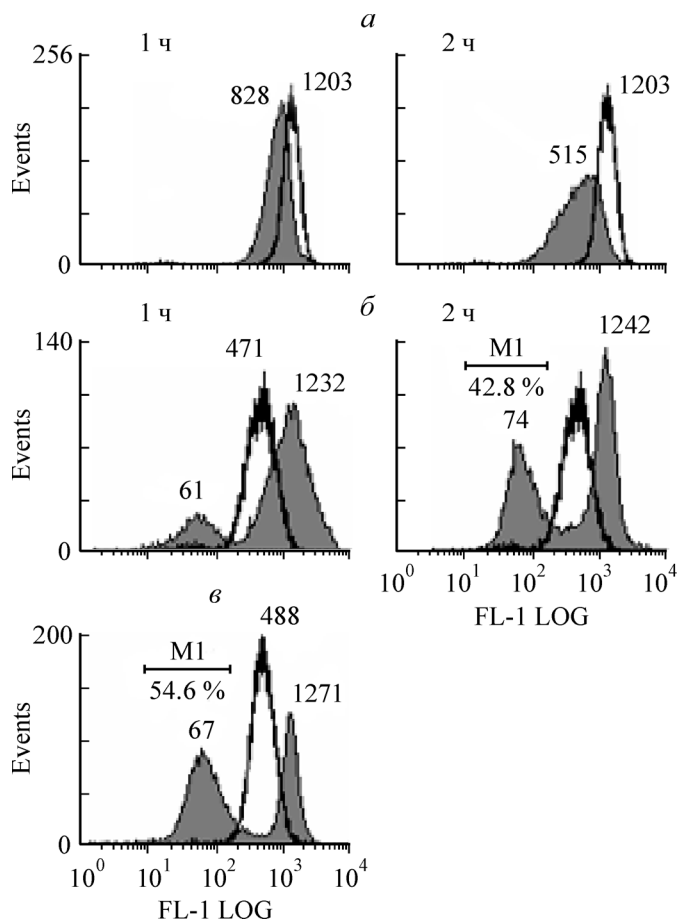


Рис. 5. Гистограммы интенсивности флуоресценции клеток STLL-2, окрашенных родамином 123, после окислительного стресса в отсутствие дефицита АФ (а), при дефиците АФ (б) или после обработки иодоацетатом (в).

Клетки STLL-2 из различных культур (см. ниже) переносили в свежей среде в культуры низкой плотности с добавлением 50 мкМ  $H_2O_2$  (а, б), культивировали 1 или 2 ч, а затем окрашивали родамином 123. а — контроль, клетки переносили из культур низкой плотности; б — дефицит АФ, клетки переносили из культур высокой плотности; в — клетки переносили из культур высокой плотности в культуры низкой плотности с добавлением 50 мкМ иодоацетата (без  $H_2O_2$ ), культивировали 2 ч, а затем окрашивали родамином 123. Средние значения интенсивности флуоресценции указаны над соответствующими пиками. Исходные гистограммы представлены в незатемненном виде. Маркер M1 отмечает клетки с деполяризованными митохондриями. Приведены данные 1 из 3 репрезентативных экспериментов.

На рис. 5 приведены типичные гистограммы интенсивности флуоресценции опытных и контрольных клеток STLL-2, окрашенных родамином 123 после окислительного стресса (50 мкМ  $H_2O_2$ ), проведенного в течение двух различных интервалов времени. Из сравнения представленных гистограмм можно сделать вывод о том, что для контрольных клеток, подвергнутых окислительному стрессу, характерно постепенное снижение МТП с плавным нарастанием доли клеток, имеющих более низкий потенциал митохондрий (рис. 5, а). В то же время клетки STLL-2, подвергнутые окислительному стрессу в условиях дефицита АФ, характеризовались резким снижением МТП и достаточно быстрым нарастанием доли клеток с деполяризованными митохондриями. При окислительном стрессе клеток в условиях дефицита АФ через 1 ч появлялось около 15 % клеток с деполяризованными ми-

тохондриями, а через 2 ч — уже более 40 % (рис. 5, б). При этом гистограмма приобретала бимодальный характер с правым пиком, соответствующим клеткам с высоким МТП, и левым пиком, соответствующим клеткам с деполяризованными митохондриями. Подобные бимодальные гистограммы флуоресценции родамина 123 мы получали также для клеток STLL-2, которые переносили из культур высокой плотности в культуры низкой плотности (условия дефицита АФ) и культивировали в течение 2 ч в отсутствие пероксида водорода, но с добавлением 50 мкМ иодоацетата — ингибитора гликолиза (рис. 5, в). При этом уровень АТФ в клетках уже через 15 мин после обработки иодоацетатом составлял лишь  $7.2 \pm 0.9$  % от исходного уровня.

В заключение настоящей работы мы провели оценку характера гибели клеток STLL-2 в условиях окислительного стресса и дефицита АФ. Как известно, гибель клеток протекает по двум путям — апоптозу и некрозу. Главной особенностью некроза является потеря клетками целостности плазматической мембраны, в то время как для ранней стадии апоптоза характерна транслокация фосфатидилсерина из внутреннего липидного слоя плазматической мембраны в ее внешний слой без разрушения мембраны (Martin et al., 1995). Использование двойного окрашивания клеток посредством аннексина V—ФИТЦ (для обнаружения фосфатидилсерина на внешней стороне клеточной мембраны) и иодида пропидия (для регистрации целостности клеток) позволяет с помощью проточной цитометрии отличить апоптоз исследуемых клеток от их некроза (Vermees et al., 1995). На двухпараметрической цитограмме «аннексин V—ФИТЦ—пропидия иодид» зона апоптоза соответствует окрашиванию только аннексином V—ФИТЦ без окрашивания иодидом пропидия (рис. 6, правый нижний квадрант), а зона некроза — двойному окрашиванию (рис. 6, правый верхний квадрант). Применение данного метода для оценки характера гибели опытных и контрольных клеток STLL-2 в условиях окислительного стресса (50 мкМ  $H_2O_2$ , 3 ч) позволило установить, что дефицит АФ приводит к массовой гибели клеток, протекающей как по пути апоптоза, так и по пути некроза (рис. 6, з). В образцах контрольных клеток, подвергнутых такому же окислительному стрессу, но в отсутствие дефицита АФ, увеличения доли погибших клеток не наблюдалось (рис. 6, а, б).

## Обсуждение

В настоящее время хорошо известно, что причиной гибели клеток при окислительном стрессе является истощение внутриклеточного АТФ (Spragg et al., 1985; Hyslop et al., 1988). Одним из главных механизмов такого истощения является активация поли(АДФ-рибозо)-полимеразы — фермента, который участвует в репарации ДНК. Он активируется разрывами ДНК и катализирует поли(АДФ-рибозилирование) белков, связанных с ДНК. Чрезмерная активация поли(АДФ-рибозо)-полимеразы при множественных разрывах ДНК, вызываемых окислительным стрессом, сильно снижает содержание внутриклеточного  $НАД^+$ , который является субстратом этого фермента, и это приводит к подавлению гликолиза и митохондриального дыхания (Hyslop et al., 1988; Virag et al., 1998). Кроме того, при окислительном стрессе наблюдается специфическая инактивация фермента глико-

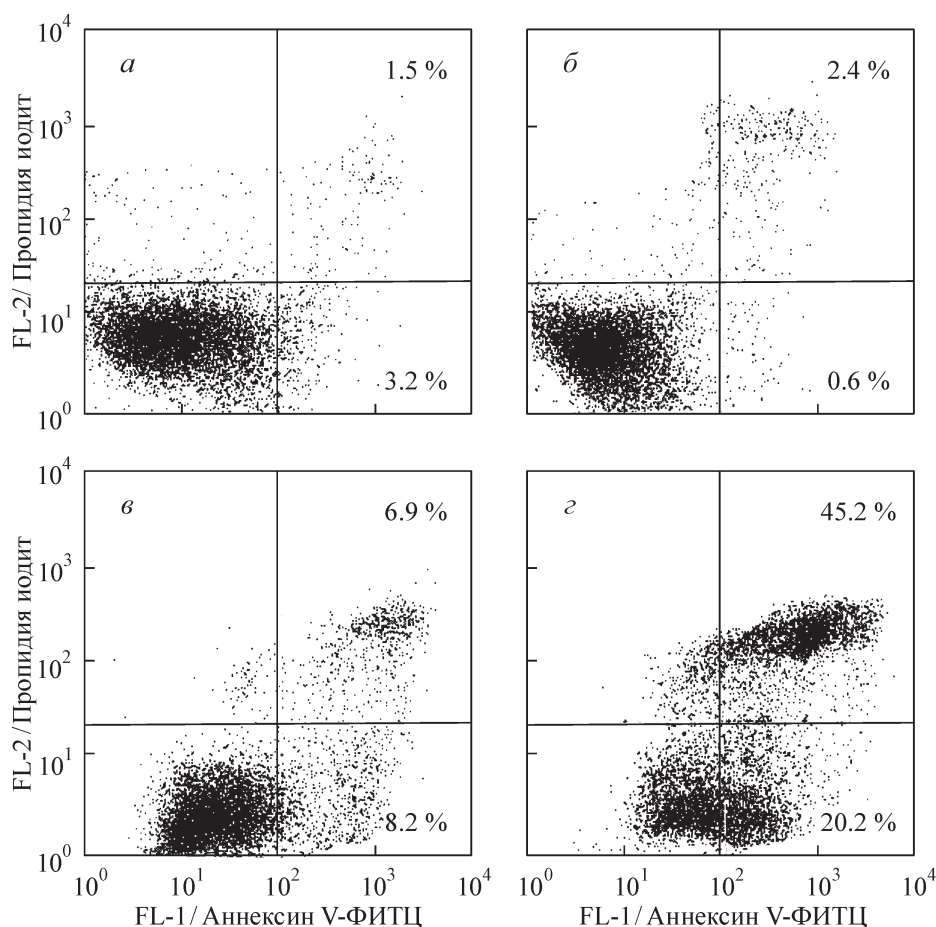


Рис. 6. Двухпараметрические цитограммы распределения клеток СТЛЛ-2 в координатах «FL-1/аннексин V-ФИТЦ» и «FL-2/пропидия иодид» до и после окислительного стресса в условиях дефицита АФ.

Клетки СТЛЛ-2 из культур низкой плотности (контроль) или культур высокой плотности (опыт) в свежей среде переносили в культуры низкой плотности с добавлением 50 мкМ  $H_2O_2$ , культивировали 3 ч, а затем окрашивали аннексином V-ФИТЦ и иодидом пропидия. *a* — контрольные клетки до окислительного стресса; *б* — контрольные клетки после окислительного стресса; *в* — опытные клетки до окислительного стресса; *г* — опытные клетки после окислительного стресса. Приведены данные 1 из 3 репрезентативных экспериментов.

лиза глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы (Huslop et al., 1988), осуществляемая посредством АДФ-рибозилирования этого фермента (Colussi et al., 2000), которая приводит к дополнительному подавлению гликолиза и истощению АТФ.

Из наших экспериментов следует, что резкое падение внутриклеточного содержания АТФ в клетках СТЛЛ-2, оказавшихся в условиях дефицита АФ, в отсутствие каких-либо стрессовых воздействий сменяется постепенным его восстановлением до нормального уровня в течение 2 ч (Луценко, Дьячкова, 2003) (рис. 3, *a*, кривая 2). По нашему мнению, восстановление уровня внутриклеточного АТФ после его падения, вызванного дефицитом АФ, отражает процесс адаптации клеток СТЛЛ-2 к новым условиям культивирования. При окислительном стрессе клеток СТЛЛ-2, оказавшихся в условиях дефицита АФ, содержание АТФ в них оставалось на низком уровне в течение всего времени клеточного стресса (рис. 3, *б*, кривая 2). Этот факт, по-видимому, указывает на то, что угнетение энергетического метаболизма клеток, вызванное окислительным стрессом, накладывается на временное нарушение энергетического метаболизма, обусловленное нехваткой АФ, и в результате такого наложения адаптации к новым условиям культивирования не происходит. Известно, что расход энергии в клетке

осуществляется в соответствии с определенной иерархией, когда в первую очередь обеспечиваются энергией процессы, критичные для выживания клетки, такие, например, как сохранение ионного состава клетки (Buttgeit et al., 2000). Процесс адаптации клеток СТЛЛ-2 к дефициту АФ является, вероятнее всего, энергозависимым, однако в иерархии расхода энергии в клетке он, по-видимому, не относится к первоочередным. Поэтому при окислительном стрессе, истощающем внутриклеточный АТФ, происходит торможение процесса адаптации, что проявляется в сохранении низкого уровня АТФ в течение всего времени окислительного стресса.

Полученные различия между средними значениями содержания АТФ в клетках, для которых окислительный стресс (50 мкМ  $H_2O_2$ , 4 ч) отягощен дефицитом АФ, и клетках, которые не испытывают нехватки АФ (0.42 и 1.78 нмоль/ $10^6$  клеток соответственно), находятся в обратной зависимости с различиями в уровнях блеббинга этих клеток при той же концентрации пероксида водорода (рис. 2). Высокий уровень блеббинга среди клеток, имеющих низкое содержание внутриклеточного АТФ, связан с нарушением цитоскелета клеток (Gabai et al., 1992) и объясняется тем, что процесс полимеризации микрофиламентов и микротрубочек требует постоянного высокого расхода энергии (Албертс и др., 1994).

## Список литературы

При исследовании влияния дефицита АФ на потенциал митохондрий при окислительном стрессе клеток СТЛЛ-2 мы обратили внимание на бимодальный характер гистограмм флуоресценции родамина 123 в опытных клетках (рис. 5, б). Возникает вопрос: почему в условиях дефицита АФ окислительный стресс приводит к появлению клеток СТЛЛ-2 либо с высокими, либо с низкими значениями МТП, в то время как клетки со средними значениями МТП отсутствуют? Отсутствие на опытных гистограммах клеток со средними значениями МТП свидетельствует о наличии быстрого перехода клеток от состояния с высоким потенциалом митохондрий к состоянию с их деполяризацией. По-видимому, интенсивный режим окислительного фосфорилирования в опытных клетках поддерживается вплоть до полного исчерпания клетками своих ресурсов, после чего происходят резкое падение МТП и деполяризация мембраны митохондрий. Подобное обострение в энергетическом состоянии клеток наблюдалось и в экспериментах, в которых гликолиз в клетках специфически ингибировал с помощью иодоацетата — ингибитора глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы. Полученные в этих экспериментах гистограммы имели бимодальный характер и были аналогичны гистограммам, полученным для опытных клеток при окислительном стрессе (рис. 5, в).

Известно, что снижение МТП в клетках, приводящее к деполяризации митохондрий, является одним из признаков апоптоза (Zamzami et al., 1995; Scarlett et al., 2000), однако некроз, наступающий, например, при клеточной гипоксии, также сопровождается деполяризацией митохондрий (Lemasters et al., 1987). Поэтому сделать какие-либо выводы о характере гибели исследуемых клеток только на основании данных, полученных при измерении МТП, не представляется возможным. В связи с этим для оценки характера гибели клеток мы использовали известный подход, который основан на регистрации фосфатидилсерина на внешней стороне плазматической мембраны с использованием белка аннексина V, меченного ФИТЦ, и регистрации целостности клеток с использованием иодида пропидия (Martin et al., 1995; Vermes et al., 1995). Мы установили, что доля апоптотических клеток СТЛЛ-2 после окислительного стресса, проведенного в течение 3 ч в условиях дефицита АФ, составила около 20 %, а доля клеток в состоянии некроза — более 45 % (рис. 6, з). Зарегистрированный нами некроз опытных клеток может быть первичным или вторичным, т. е. наступившим после запуска апоптоза (Darzynkiewicz et al., 1997), однако различить эти два типа некроза в рамках данного подхода не представляется возможным.

Полученные в настоящей работе результаты показывают, что при окислительном стрессе клеток СТЛЛ-2 дефицит АФ, вызывая значительное снижение уровня внутриклеточного АТФ, приводит к отягощению клеточного стресса, что проявляется в усилении блеббинга клеточной поверхности, появлении большого количества клеток с деполяризованными митохондриями и в конечном итоге — в ускорении их гибели по пути апоптоза или некроза.

Авторы выражают благодарность за участие в проведении работы Вильяму Тэлфорду (William Telford; Национальный институт здоровья — НИИ, США).

Работа выполнена при финансовой поддержке программы «Молекулярная и клеточная биология» президиума РАН.

Албертс Б., Брей Д., Льюис Дж., Рэфф М., Робертс К., Уотсон Дж. 1994. Молекулярная биология клетки. Пер. с англ. М.: Мир. 2 : 540 с.

Габай В. Л., Кабаков А. Е., Макарова Ю. М., Мосина В. А., Мосин А. Ф. 1994. Фрагментация ДНК асцитной карциномы Эрлиха при воздействиях, вызывающих агрегацию белков цитоскелета. Биохимия. 59 (4) : 551—558.

Луценко Г. В., Дьячкова Л. Г. 2003. Роль энергетического метаболизма клеток цитотоксической линии СТЛЛ-2 в механизме контроля их выживания аутокринными факторами. Биол. мембраны. 20 (5) : 401—408.

Луценко Г. В., Дьячкова Л. Г., Сапожников А. М. 2001. Контроль выживания клеток цитотоксической линии СТЛЛ-2 аутокринными факторами. Роль плотности клеточных культур. Биол. мембраны. 18 (4) : 312—319.

Плетюшкина О. Ю., Фетисова Е. К., Лямзаев К. Г., Иванова О. Ю., Домнина Л. В., Высоких М. Ю., Пустовидко А. В., Алексецкий А. В., Алексецкий Д. А., Васильев Ю. М., Мерфи М. П., Черняк Б. В., Скулачев В. П. 2006. Пероксид водорода, образуемый внутри митохондрий, участвует в передаче апоптотического сигнала от клетки к клетке. Биохимия. 71 (1) : 75—84.

Bellomo G., Mirabelli F., Salis A., Vairetti M., Richelmi P., Finardi G., Thor H., Orrenius S. 1988. Oxidative stress-induced plasma membrane blebbing and cytoskeletal alterations in normal and cancer cells. Ann. N. Y. Acad. Sci. 551 : 128—130.

Buttgereit F., Burmester G.-R., Brand M. D. 2000. Bioenergetics of immune functions: fundamental and therapeutic aspects. Immunol. Today. 21 : 192—199.

Buttke T. M., Sandstrom P. 1994. Oxidative stress as a mediator of apoptosis. Immunol. Today. 15 : 7—10.

Colussi C., Albertini M. C., Coppola S., Rovidati S., Galli F., Ghibelli L. 2000. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced blocking of glycolysis as an active ADP-ribosylation reaction protecting cells from apoptosis. FASEB J. 14 : 2266—2276.

Darzynkiewicz Z., Juan G., Li X., Gorczyca W., Murakami T., Traganos F. 1997. Cytometry in cell necrobiology: analysis of apoptosis and accidental cell death (necrosis). Cytometry. 27 : 1—20.

Denizot F., Lang R. 1986. Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. J. Immunol. Meth. 82 : 271—277.

Gabai V. L., Kabakov A. E., Mosin A. F. 1992. Association of blebbing with assembly of cytoskeletal proteins in ATP-depleted EL-4 ascites tumour cells. Tissue and Cell. 24 : 171—177.

Gerweck L. E. 1985. Hyperthermia in cancer therapy: the biological basis and unresolved questions. Cancer Res. 45 : 3408—3414.

Huss R., Hoy C. A., Deeg H. J. 1995. Contact- and growth factor-dependent survival in a canine marrow-derived stromal cell line. Blood. 85 : 2414—2421.

Hyslop P. A., Hinshaw D. B., Halsey W. A., Schraufstatter I. U., Sauerheber R. D., Spragg R. G., Jackson J. H., Cochran C. G. 1988. Mechanisms of oxidant-mediated cell injury. The glycolytic and mitochondrial pathways of ADP phosphorylation are major intracellular targets inactivated by hydrogen peroxide. J. Biol. Chem. 263 : 1665—1675.

Ishizaki Y., Burne J. F., Raff M. C. 1994. Autocrine signals enable chondrocytes to survive in culture. J. Cell Biol. 126 : 1069—1077.

Ishizaki Y., Voyvodic J. T., Burne J. F., Raff M. C. 1993. Control of lens epithelial cell survival. J. Cell Biol. 121 : 899—908.

Lemasters J. J., DiGuiseppi J., Nieminen A.-L., Herman B. 1987. Blebbing, free Ca<sup>2+</sup> and mitochondrial membrane potential preceding cell death in hepatocytes. Nature. 325 : 78—81.

Marrack P., Mitchell T., Bender J., Hildeman D., Kedd R., Teague T. K., Kappler J. W. 1998. T-cell survival. Immunol. Rev. 165 : 279—285.

Martin S. J., Reutelingsperger C. P. M., McGahon A. J., Rader J. A., Van Schie R. C. A. A., LaFace D. M., Green D. R. 1995.

Early redistribution of plasma membrane phosphatidylserine is a general feature of apoptosis regardless of initiating stimulus: inhibition by overexpression of Bcl-2 and Abl. *J. Exp. Med.* 182 : 1545—1556.

Matzinger P. 1994. Tolerance, danger and the extended family. *Annu. Rev. Immunol.* 12 : 991—1045.

Rathmell J. C., Farkash E. A., Gao W., Thompson C. B. 2001. IL-7 enhances the survival and maintains the size of naive T cells. *J. Immunol.* 167 : 6869—6876.

Scarlett J. I., Sheard P. W., Hughes G., Ledgerwood E. C., Ku H.-H., Murphy M. P. 2000. Changes in mitochondrial membrane potential during staurosporine-induced apoptosis in Jurkat cells. *FEBS Lett.* 475 : 267—272.

Shapiro H. M. 2003. Practical flow cytometry. Hoboken. New York: Wiley-Liss. 681 p.

Solursh M. 1991. Formation of cartilage tissue *in vitro*. *J. Cell Biochem.* 45 : 258—260.

Spragg R. G., Hinshaw D. B., Hyslop P. A., Schraufstatter I. U., Cochrane C. G. 1985. Alterations in adenosine triphosphate and energy charge in cultured endothelial and P388D<sub>1</sub> cells after oxidant injury. *J. Clin. Invest.* 76 : 1471—1476.

Teague T. K., Marrack P., Kappler J. W., Vella A. 1997. IL-6 rescues resting mouse T cells from apoptosis. *J. Immunol.* 158 : 5791—5796.

Vander Heiden M. G., Plas D. R., Rathmell J. C., Fox C. J., Harris M. H., Thompson C. B. 2001. Growth factors can influence cell growth and survival through effects on glucose metabolism. *Mol. Cell. Biol.* 21 : 5899—5912.

Vella A., Teague T. K., Ihle J., Kappler J. W., Marrack P. 1997. Interleukin 4 (IL-4) or IL-7 prevents the death of resting T cells: stat 6 is probably not required for the effect of IL-4. *J. Exp. Med.* 186 : 325—330.

Vermes I., Haanen C., Steffens-Nakken H., Reutelingsperger C. 1995. A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labeled annexin V. *J. Immunol. Meth.* 184 : 39—51.

Virag L., Salzman A. L., Szabo C. 1998. Poly(ADP-ribose) synthetase activation mediates mitochondrial injury during oxidant-induced cell death. *J. Immunol.* 161 : 3753—3759.

Zamzami N., Marchetti P., Castedo M., Zanin C., Vayssiere J.-L., Petit P. X., Kroemer G. 1995. Reduction in mitochondrial potential constitutes an early irreversible step of programmed lymphocyte death *in vivo*. *J. Exp. Med.* 181 : 1661—1672.

Поступила 15 VIII 2006

#### INFLUENCE OF AUTOCRINE FACTOR DEFICIT IN CULTURE ON SURVIVAL AND ENERGY METABOLISM OF CTLL-2 CELLS UNDER OXIDATIVE STRESS

G. V. Lutsenko, M. V. Grechikhina, L. G. Diachkova, N. I. Lutsan

Shemyakin and Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry RAS, Moscow;  
e-mail: gvlut@mail.ibch.ru

A lot of data has shown recently that survival of mammalian cells is under a control of growth factors and autocrine survival factors (AF). We studied the influence of AF deficit on survival, intracellular ATP content, and transmembrane potential of mitochondria of IL-2-dependent CTLL-2 cells under oxidative stress. CTLL-2 cells cultivated under deficit of AF have been shown to be more susceptible to oxidative injury in comparison with the cells cultivated without deficit of AF (control); they died at smaller concentrations of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> than control cells did. The ATP content in CTLL-2 cells was decreased under AF deficit conditions even without any stress and treatment of the cells by hydrogen peroxide resulted in additional large decrease of it. ATP depression was accompanied by disruption of cell membrane (blebbing) and drop of mitochondrial potential. Cell death under oxidative stress in the presence of AF deficit has been shown to proceed by both apoptosis and necrosis.