

РОТЕНОН, РОДАМИН 123 И ЯНУС ЗЕЛЕННЫЙ ИНДУЦИРУЮТ ПОВРЕЖДЕНИЕ ЯДЕРНОЙ ДНК В КЛЕТКАХ АСЦИТНЫХ ОПУХОЛЕЙ МЫШЕЙ, РОТЕНОН И РОДАМИН В Х-ОБЛУЧЕННЫХ КЛЕТКАХ СПОБСТВУЮТ СОХРАНЕНИЮ ЦЕЛОСТНОСТИ ГЕНОМА

© 2024 г. Е.А. Кузнецова*, #, Н.П. Сирота*

*Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН,
Институтская ул., 3, Пушкино Московской области, 142290, Россия

#E-mail: kuzglu@rambler.ru

Поступила в редакцию 10.06.2024 г.

После доработки 10.06.2024 г.

Принята к публикации 19.06.2024 г.

Митохондриальные ингибиторы ротенон, родамин 123 и краситель янус зеленый В изучаются в настоящее время с целью разработки фармакологических средств, вызывающих митохондриальную дисфункцию и апоптоз. Поскольку нарушение работы митохондрий связано с продукцией активных форм кислорода, то представляется актуальным сопоставить индуцированные этими веществами повреждения ДНК клеток асцитной карциномы Эрлиха и мышинового лимфолейкоза Р388 с таковыми после воздействия известного индуктора активных форм кислорода — ионизирующего (рентгеновского) излучения. Уровень ДНК-повреждений оценивали щелочным вариантом метода ДНК-комет. Индуцированный ротеноном уровень повреждений ДНК был сравним с таковым при 4 Гр в обоих типах клеток. Пострадиационная инкубация уменьшала уровень ДНК-повреждений, что свидетельствовало о репарации ДНК. Обработка клеток асцитной карциномы Эрлиха родамином 123 с последующей отмывкой от него не вызывала этого увеличения, однако облучение в дозе 4 Гр в присутствии родамина 123 индуцировало увеличение уровня повреждений ДНК, которое существенно уменьшалось после часовой инкубации. Можно полагать, что предварительная обработка клеток ротеноном или родамином 123, нарушая работу митохондрий, способствовала сохранению целостности ядерной ДНК в облученных клетках. Воздействие януса зеленого В вызывало увеличение повреждений ДНК и гибель клеток. Исходя из щелочной версии метода ДНК-комет, можно считать индуцированные этими соединениями повреждения одно-, двуниевыми разрывами и щелочеллабильными (апуриновыми/апирииминовиными) сайтами в ДНК.

Ключевые слова: асцитная карцинома Эрлиха, мышинный лимфолейкоз Р388, ротенон, родамин 123, янус зеленый В, метод ДНК-комет.

DOI: 10.31857/S0006302924040094, EDN: NGXPOM

Для оценки работы митохондрий традиционно применяются ингибиторы, такие как ротенон, родамины (в частности, родамин 123) и янус зеленый В. Ротенон является одним из нейротоксинов окружающей среды, известен как пестицид, инсектицид и рыбий яд [1, 2]. Ротенон — сложный изофлавоноид (органическое гетеропентациклическое соединение), встречающийся в корнях и стеблях ряда растений, является специфическим ингибитором тканевого дыхания:

воздействует на комплекс I, подавляет электрон-транспортную цепь митохондрий. В результате образуются генотоксические/цитотоксические активные формы кислорода (АФК). В экспериментах при подкожном введении крысам ротенон было показано, что в продукции АФК в ткани головного мозга задействован и комплекс II дыхательной цепи митохондрий [3]. В экспериментах на клеточном и субклеточном уровне показано, что ротенон индуцирует продукцию АФК как в изолированных митохондриях из клеток HL-60, так и в культивируемых клетках, что в конечном итоге приводит к дисфункции митохондрий и апоптозу. Это подтверждается фрагментацией ДНК, высвобождением цитохрома c и активно-

Сокращения: АФК — активные формы кислорода, RH-123 — родамин 123, JGB — янус зеленый В (Janus Green B), АКЭ — асцитная карцинома Эрлиха, PBS — фосфатно-солевой буфер.

стью каспазы 3 [4]. В экспериментах *in vitro* с использованием ооцитов свиньи было показано, что обработка ротеноном снижала соотношение активных митохондрий к общему количеству митохондрий, снижала продукцию АТФ и повышала продукцию АФК; полагают, что митохондриальная дисфункция, вызванная ротеноном, увеличивала и митофагию [5]. Помимо нарушений работы митохондрий, ротенон вызывает аномалии других субклеточных органоидов, нарушения в работе клеточных мембран, изменение профиля метилирования ДНК, способствует индукции ферроптоза, некроптоза [6–8]. Анализ флуоресцентных изображений выявил чувствительность органелл к ротенону в следующем порядке: микротубулярный цитоскелет, митохондриальная сеть, эндоплазматический ретикулум, аппарат Гольджи и лизосомальная сеть [9]. Индуцированная ротеноном цитотоксичность используется для создания животных моделей — аналогов заболеваний человека [10–13]. Его воздействие на живые организмы рассматривают как общую экспериментальную модель для исследования основных механизмов, ведущих к болезни Паркинсона, и для оценки новых потенциальных методов лечения этого заболевания. [14–17]. Кроме того, ротенон пытаются использовать в качестве фармакологического средства из-за его способности ингибировать комплекс I в митохондриях опухолевых клеток [18, 19], а также он применяется для изучения старения клеток человека [20].

Родамин 123 (RH-123) представляет собой катионный флуоресцентный краситель, который используется для специфической маркировки дышащих митохондрий и мониторинга их функции. Краситель распределяется по внутренней мембране митохондрий в соответствии с отрицательным мембранным потенциалом. Потеря потенциала приводит к потере красителя и, следовательно, к потере интенсивности флуоресценции [21, 22]. Если в ранних работах RH-123 использовали в качестве специфического зонда для определения местонахождения и изменений в распределении митохондрий в клетке [23], то в более поздних его пытались использовать для обогащения гемопоэтических стволовых клеток животных, выявления длительно репопулирующих гемопоэтических стволовых клеток человека в популяции Lin-CD34+CD38- [24–26], для исследования процессов мембранного транспорта [27], для изучения биораспределения RH-123, меченого по углероду (^{14}C), в тканях грызунов при его внутривенном введении [28]. Кроме того, в настоящее время RH-123 и его производные исследуются в качестве терапевтических средств, нацеленных на митохондрии, а также для изучения лекарственной устойчивости, поскольку было обнаружено, что RH-123 связывается с несколькими сайтами белка множественной лекар-

ственной устойчивости — MRP1 [29–32]. При этом RH-123 предлагают использовать не только в качестве собственно лекарственного средства, но и для адресной доставки в митохондрии лекарств, содержащихся в липосомах с поверхностью, модифицированной RH-123-конъюгированным полимером [33]. В экспериментах *in vitro* на различных типах клеток было обнаружено, что RH-123 не токсичен при его кратковременном применении. Однако при непрерывном воздействии был обнаружен цитотоксический эффект RH-123 в отношении клеток карциномы по сравнению с нормальными эпителиальными клетками [34]. В результате исследований большого количества природных агентов, которые способны воздействовать на митохондрии и проявлять противоопухолевую активность, появился термин «митоканы» (mitocans). Митоканами называют категорию лекарств, которые точно нацелены на митохондрии раковых клеток. Вызывая нарушение работы митохондрий, эти вещества способны вызывать клеточный стресс в раковых клетках и, в конечном итоге, митохондриально-опосредованный апоптоз. В зависимости от способа действия митоканов их делят на восемь классов. По этой классификации RH-123 относят к 6-му классу — липофильные катионы, нацеленные на внутреннюю мембрану (Lipophilic Cations Targeting the Inner Membrane) [35].

Янус зеленый В (JGB — Janus Green B) — органическое водорастворимое соединение, надживотный (supravital) липофильный катионный краситель, относящийся к диазотированным сафранинам, поглощается и восстанавливается метаболически активными митохондриями. Цитологическое исследование показало, что JGB может восстанавливаться как в митохондриальной, так и в немитохондриальной частях клетки [36]. Он используется для оценки чистоты, целостности и метаболической активности митохондрий, клеточной жизнеспособности [37–40], для анализа ДНК [41], для выявления разнообразия митохондрий, новых типов клеток и новых структур в тканях и сосудах [42–45], в качестве антимиохондриального фактора для поиска лекарственных средств, способных воздействовать на внутриклеточных паразитов [46, 47], для идентификации микроорганизмов [48].

Несмотря на то, что цитотоксичность этих соединений для клеток млекопитающих известна давно [11, 35, 49–51], все же они представляют собой важный класс субклеточных зондов и позволяют исследовать клеточные процессы в реальном времени с минимальным влиянием на них. Кроме того, в последнее время они исследуются как в качестве возможных терапевтических средств, так и базиса для создания на их основе фармакологических препаратов, применяемых для лечения онкологических заболеваний [18, 19,

30, 32]. Следствием их избирательного влияния на митохондрии являются развитие митохондриальной дисфункции и продукция АФК. Митохондрии являются самым богатым источником АФК, так как они потребляют примерно 80% молекулярного кислорода во время окислительного фосфорилирования [52, 53]. Воздействие АФК приводит к повреждению митохондриальной ДНК, поскольку непосредственная близость к местам продукции АФК делает митохондриальную ДНК особенно восприимчивой к повреждению. Митохондрией в клетке обычно располагаются вблизи органоидов, потребляющих большое количество АТФ, — элементов цитоскелета и ядра. Митохондриальная дисфункция может в значительной степени способствовать нарушению окислительно-восстановительных реакций в клетке и повреждению ядерной ДНК. В настоящей работе представлялось актуальным выявить индуцированные ротеноном, RH-123 и JGB повреждения ДНК клеток асцитной карциномы Эрлиха (АКЭ) и мышинного лимфолейкоза Р388 и сопоставить их с таковыми после воздействия известного индуктора активных форм кислорода — ионизирующего излучения. В качестве положительного контроля (источник АФК) использовали воздействие рентгеновского излучения на эти клетки. Известно, что при облучении фотонами (гамма- или рентгеновское излучение) основное повреждающее действие на ДНК и другие биологические молекулы оказывают АФК, образующиеся при радиоллизе воды. Кроме того, ионизирующее излучение также вызывает развитие митохондриальной дисфункции и производство АФК митохондриями на протяжении пострадиационного периода [52, 54]. Однако АФК образуются и в ходе нормальных клеточных метаболических процессов (в основном это $O_2^{\bullet-}$ и H_2O_2), что приводит к обширной депуринизации и в меньшей степени депиримидинизации в ДНК интактных клеток [52]. Индуцированные физико-химическими факторами повреждения ДНК представлены более разнообразным и высоким уровнем повреждений ДНК: одно- и двунитевыми разрывами, модификацией оснований или их утратой и сшивками. Исходя из этого, в настоящей работе для определения уровня повреждений ДНК использовали щелочную версию метода ДНК-комет (comet assay). Этот метод позволяет выявлять одно- и двунитевые разрывы и реализованные в разрывы при высоком pH щелочелабильные (апуриновые/апиримидиновые) сайты в ДНК [55].

Цель работы: выявить индуцированные RH-123, ротеноном и JGB уровни повреждений ядерной ДНК клеток асцитной карциномы Эрлиха и мышинного лимфолейкоза Р388 и сопоставить их с

такowymi при воздействии рентгеновского излучения.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Животные и клетки. Использовали инбредных мышей-самцов линии DBA 2 (окраска шерсти — ослабленный коричневый) массой примерно 19–20 г, полученных из НПП «Питомник лабораторных животных» ФИБХ РАН (Пушино, Московская область), и белых аутбредных мышей-самцов линии SHK массой примерно 24–30 г, содержащихся в стандартных условиях вивария ИТЭБ РАН.

Клетки лимфолейкоза Р388 (клетки Р388), полученные из Лаборатории окислительного стресса ИТЭБ РАН, выращивали в брюшной полости мышей-самцов DBA 2, прививали внутрибрюшинно $2 \cdot 10^6$ клеток на мышь. Через 7 суток после прививки мышей умерщвляли методом цервикальной дислокации, клетки извлекали из брюшной полости, трижды промывали средой RPMI 1640 (Sigma Chem. Co., США) и подсчитывали в камере Горяева.

Клетки асцитной карциномы Эрлиха (клетки АКЭ), полученные из лаборатории клеточной инженерии ИТЭБ РАН, поддерживали путем еженедельной внутрибрюшинной перевивки (10^7 клеток в 0.5 мл физиологического раствора) мышам-самцам SHK. Через 7 суток после прививки мышей умерщвляли методом цервикальной дислокации, клетки извлекали из брюшной полости, трижды промывали раствором Хенкса и подсчитывали в камере Горяева.

Облучение. Суспензии клеток АКЭ или Р388 были облучены на рентгеновской установке РУТ-250-15-1 в ЦКП «Источники излучений» ИБК РАН (Пушино, Московская область) при мощности дозы 1.12 Гр/мин, напряженности 200 кВ, силе тока 20 мА, фильтры 1 мм Al и 1 мм Cu, фокусное расстояние 37 см. Дозиметрию проводили по методу Фрике в присутствии бензойной кислоты и с помощью дозиметра VA-J-18 (RFT, Германия).

Эксперименты с ротеноном. К клеткам Р388 или АКЭ перед облучением добавляли 0.04% ротенона (Sigma Chem. Co., США), разведенного в этаноле (конечная концентрация этанола — 0.1%). Клетки Р388 облучали в дозах 2, 4 и 8 Гр на льду, без добавления сыворотки, чтобы избежать ее радиозащитного эффекта. После облучения перед инкубацией добавляли 10% эмбриональной телячьей сыворотки. Клетки Р388 с 0.04% ротенона, не подвергавшиеся облучению, инкубировали во льду до момента приготовления слайдов. Клетки АКЭ облучали в дозе 4 Гр при комнатной температуре, также без добавления сыворотки. После облучения перед инкубацией добавляли 10%

сыворотки. Клетки АКЭ с 0.04% ротенона, не подвергавшиеся облучению, инкубировали при комнатной температуре до момента приготовления слайдов. После облучения все клетки инкубировали в присутствии ротенона при 37°C при постоянном перемешивании.

Эксперименты с родамином 123. К клеткам АКЭ перед облучением добавляли 0.025% RH-123 (Sigma Chem. Co., США), разведенного в этаноле (конечная концентрация этанола — 0.02%), инкубировали 15 мин при 37°C, затем трижды отмывали фосфатно-солевым буфером (PBS) и облучали при комнатной температуре в дозе 4 Гр. После облучения часть проб инкубировали в PBS, pH 7.2, при 37°C, без добавления сыворотки.

Эксперименты с красителем JGB. К клеткам АКЭ добавляли 0.005% JGB (Sigma Chem. Co., США), растворенного в PBS, инкубировали разное время при 37°C в PBS.

Оценка количества клеток с поврежденной мембраной/мертвых. Количество мертвых клеток оценивали с использованием трипанового синего, как указано в работе [56], или пропидиум иодида.

Метод ДНК-комет. Вначале предметные стекла погружали в раствор 1%-й нормальной агарозы и высушивали. На эти стекла наносили слой той же 1%-й агарозы со стандартной температурой плавления и инкубировали в холодильнике до ее затвердевания (5–7 мин). Для приготовления агарозных слайдов клетки разводили до концентрации $1 \cdot 10^6$ кл/мл. Суспензию клеток смешивали с равным объемом 1%-й легкоплавкой агарозы (Sigma Chem. Co., США), приготовленной на буфере PBS (136.7 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 8.1 mM Na_2HPO_4 , 1.5 mM KH_2PO_4 , pH 7.2). Агарозу расплавляли при 70°C и инкубировали при 37°C (конечная температура получаемой смеси агарозы с клетками 20–22°C). Смесь (15 мкл) наносили на приготовленный агарозный слой. После охлаждения и застывания содержащей клетки агарозы на ее поверхность наносили новый слой 0.5%-й легкоплавкой агарозы. Слайды помещали в лизирующий раствор (2.5 моль/л NaCl, 0.1 моль/л ЭДТА, 0.01 моль/л Трис-HCl, pH 10.0, 1% Тритона X-100) при 4°C на 20–24 ч. Затем их инкубировали в течение 20 мин в щелочном растворе «А» (0.3 моль/л NaOH, 0.001 моль/л ЭДТА, pH > 13), далее переносили в электрофоретическую камеру SE-1/S-1N (ООО «Компания Хеликон», Москва, Россия) и подвергали электрофорезу в свежей порции раствора «А» в течение 20 мин при 4°C, объем буфера 250 мл, напряжение 27 В, сила тока 260–270 мА (напряженность электрического поля 2 В/см). После электрофореза слайды трижды промывали дистиллированной водой и окрашивали в течение 1 ч в PBS, содержащем 2.0 мкг/мл этидиум бромид. Слайды анализировали под

флуоресцентным микроскопом ЛЮМАМ И-3 («ЛМО», Санкт-Петербург, Россия). Захват изображений проводили цифровым фотоаппаратом CoolPix 995 (Nikon, Япония) с последующей передачей изображений в компьютер. Обработку изображений выполняли с помощью специализированного программного обеспечения с реализованными алгоритмами расчета стандартных параметров комет [57]. Для оценки уровня повреждений ДНК использовали параметр «процентная доля ДНК в хвосте кометы» (per cent of DNA in a comet tail — %TDNA). Для каждой экспериментальной точки анализировали по 3 слайда, фотографируя не менее чем по 50 клеток на слайд, согласно работе [58].

Статистический анализ. Статистический анализ проводили с использованием *t*-критерия Стьюдента ($p \leq 0.05$).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Воздействие ротенона на клетки Р388 вызывает повреждение ядерной ДНК; ротенон не препятствует репарации ДНК в пострadiационном периоде. В предварительном исследовании определили зависимость «доза-эффект» при воздействии рентгеновского излучения на клетки Р388. На рис. 1а показан уровень повреждений ДНК (%TDNA) клеток Р388, измеренный сразу после облучения клеточной суспензии в дозах 2–8 Гр.

Видно, что с ростом дозы увеличивался %TDNA, который при 8 Гр достоверно отличался от контроля ($p < 0.05$). На рис. 1б показано изменение количества поврежденных/мертвых клеток сразу после облучения (окрашивание выявляет клетки с поврежденной мембраной). Наблюдалась лишь тенденция увеличения количества поврежденных клеток с ростом дозы, достоверных отличий от контроля не обнаружено. Исходя из дозовых зависимостей, в дальнейших экспериментах клетки облучали в дозе 4 Гр. Окрашивание интактных клеток трипановым синим или пропидиум иодидом показало, что для клеток Р388 предпочтительна среда RPMI 1640, тогда как клетки АКЭ более стабильны и в течение эксперимента могут храниться в растворе Хенкса или в PBS.

На рис. 2а показан %TDNA клеток Р388, облученных в дозе 4 Гр и инкубированных после облучения в течение 0.5–1.5 ч в среде RPMI 1640 с сывороткой. Облучение проводили на льду. Видно, что воздействие рентгеновского излучения вызывало существенное увеличение уровня %TDNA, который через 0.5 ч после облучения уменьшался. %TDNA в пробе «4 Гр» достоверно отличался от такового в пробе «без облучения_1.5 ч» ($p = 0.02$). Поскольку %TDNA в пробе «4 Гр_0.5 ч» достоверно не отличался от такового в пробе

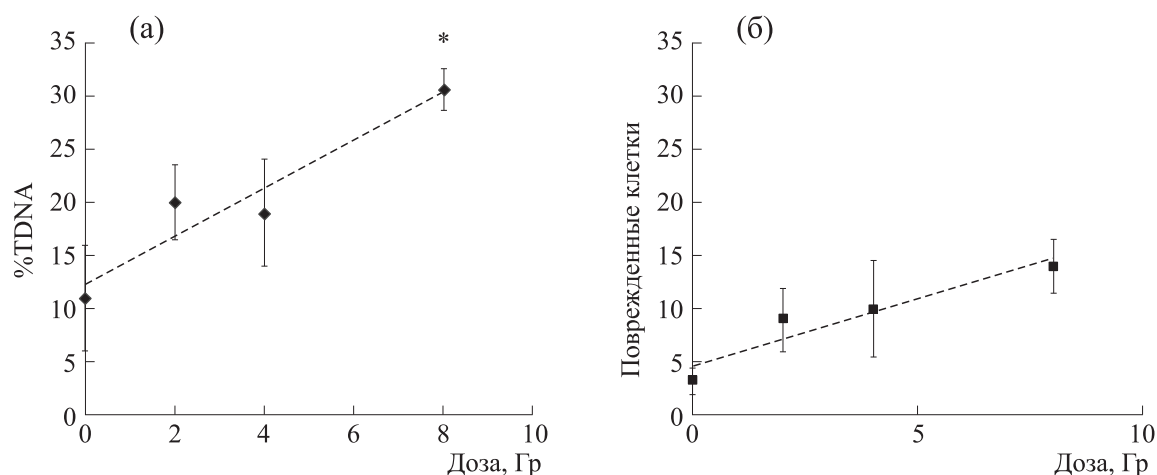


Рис. 1. Уровень повреждений ДНК (%TDNA) и количество поврежденных клеток мышино лимфолейкоза P388: (а) — уровень повреждений ДНК клеток P388, измеренный сразу после облучения клеточной суспензии в дозах 2–8 Гр (* — $p \leq 0.05$); (б) — количество клеток с поврежденной мембраной, окрашенных пропидиумидом, определенное сразу после облучения; достоверных отличий от контроля не обнаружено. Приведены средние значения $\pm$ стандартное отклонение ($M \pm SD$).

«4 Гр_1.5 ч», то в дальнейших экспериментах клетки после облучения инкубировали в течение 0.5 ч. На рис. 26 показано изменение %TDNA клеток P388, облученных в дозе 4 Гр в присутствии 0.04% ротенона (проба «ROT»). Видно, что при добавлении ротенона к необлученным клеткам %TDNA увеличивался почти до уровня, наблюдающегося при 4 Гр. Отличия между пробами «4 Гр» и «ROT» статистически недо-

верны. При добавлении к клеткам ротенона и последующем их облучении %TDNA также увеличивался. Пробы «4 Гр» и «ROT + 4 Гр» достоверно отличались от контроля ($p = 0.02$ и $p = 0.04$ соответственно). После облучения клеточные суспензии были инкубированы в среде RPMI 1640 с сывороткой в присутствии ротенона. %TDNA в пробе «ROT + 4 Гр_0.5 ч» существенно умень-

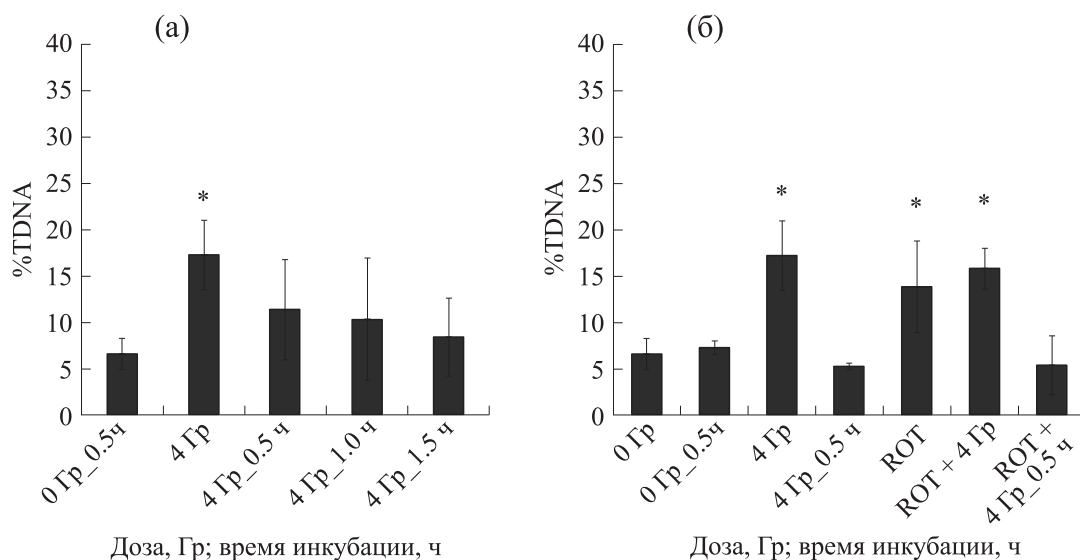


Рис. 2. Уровень повреждений ДНК (%TDNA) клеток мышино лимфолейкоза P388, облученных и/или обработанных ротеноном (ROT). (а) — Уровень повреждений ДНК клеток P388, облученных в дозе 4 Гр и инкубированных после облучения 0.5–1.5 ч в среде RPMI 1640 с сывороткой; проба «4 Гр» достоверно отличается от «0 Гр_1.5 ч» (* — $p < 0.05$); (б) — уровень повреждений ДНК клеток P388, облученных в дозе 4 Гр в отсутствие и в присутствии 0.04% ротенона. Клеточные суспензии инкубированы в среде RPMI 1640 с сывороткой в присутствии ротенона; пробы «4 Гр», «ROT» и «ROT + 4 Гр» достоверно отличались от контроля (* — $p \leq 0.05$). Приведены средние значения $\pm$ стандартное отклонение ($M \pm SD$).

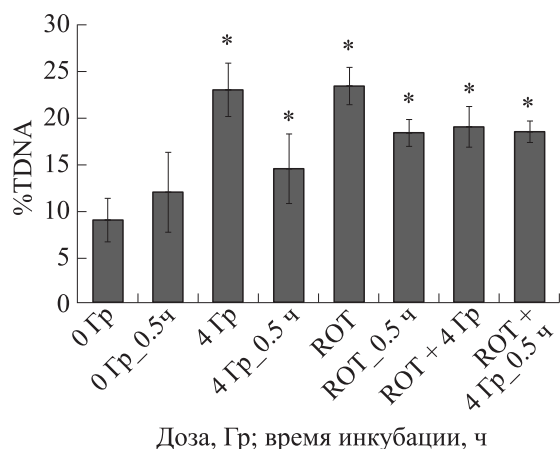


Рис. 3. Уровень повреждений ДНК (%TDNA) клеток АКЭ, облученных в отсутствие и в присутствии 0.04% ротенона (ROT). Ротенон был добавлен непосредственно перед облучением. Клеточные суспензии после облучения были инкубированы в растворе Хенкса с сывороткой в присутствии ротенона; все пробы, за исключением пробы «0 Гр_0.5 ч», достоверно отличались от контроля (* — $p \leq 0.05$). Приведены средние значения $\pm$ стандартное отклонение ($M \pm SD$).

шался по сравнению с «ROT + 4 Гр» и был сравним с контрольным.

При оценке количества мертвых клеток, где оценивали клетки с поврежденной цитоплазматической мембраной, обнаружено, что их количество было сопоставимо с контрольным уровнем во всех вариантах экспериментов с ротеноном. Общее количество клеток в пробах также не изменялось.

Воздействие ротенона на клетки асцитной карциномы Эрлиха вызывает повреждение ядерной ДНК. На рис. 3 показан %TDNA клеток АКЭ, облученных в дозе 4 Гр в присутствии 0.04% ротенона. Облучение проводили при комнатной температуре. После облучения клетки были инкубированы в растворе Хенкса с сывороткой.

Видно, что воздействие рентгеновского излучения на клетки АКЭ вызывало существенное увеличение %TDNA. %TDNA в пробе «4 Гр» достоверно отличался от такового в пробе «0 Гр» ($p = 0.003$). В процессе пострадиационной инкубации %TDNA снижался. Уже через 0.5 ч после облучения наблюдалось уменьшение %TDNA примерно до уровня пробы «0 Гр_0.5 ч». Добавление ротенона приводило к увеличению %TDNA как в необлученных, так и в облученных клетках; %TDNA во всех этих пробах достоверно отличался от контроля. Отличия %TDNA между пробами «4 Гр» и «ROT», а также между «ROT» и «ROT + 4 Гр» статистически недостоверны. Полчасовая инкубация не выявила разницы между пробами «ROT_0.5 ч» и «ROT + 4 Гр_0.5 ч»,

%TDNA в этих пробах был сопоставим с таковым в пробе «ROT + 4 Гр».

Воздействие родамина 123 на клетки асцитной карциномы Эрлиха вызывает повреждение ядерной ДНК; родамин 123 способствует репарации ДНК в пострадиационном периоде. В следующей серии экспериментов после 15 мин инкубации клеток АКЭ с 0.025% RH-123 их трижды промывали PBS. Поскольку в этих экспериментах облучение проводили при комнатной температуре, клетки с RH-123, не подвергавшиеся облучению, также находились при 20°C до момента приготовления слайдов. На рис. 4 показан %TDNA клеток АКЭ, обработанных и не обработанных RH-123 и облученных в дозе 4 Гр.

Видно, что кратковременная обработка клеток RH-123 с последующей отмывкой от него не сказывалась на величине %TDNA, она была сопоставима с таковой в контроле («0 Гр»). В пробе «4 Гр» наблюдалось существенное увеличение %TDNA, достоверно отличающееся от контроля ($p = 0.017$). В пробах «4 Гр_0.5 ч» и «RH-123 + 4 Гр_0.5 ч» также наблюдался повышенный и достоверно отличающийся от контроля %TDNA ($p = 0.02$ и $p = 0.01$ соответственно). В случае предварительной обработки RH-123 и последующем облучении %TDNA оставался высоким, достоверные отличия между пробами «4 Гр» и «RH-123 + 4 Гр» не обнаружены. Получасовая пострадиационная инкубация существенно не снижала %TDNA как в присутствии RH-123, так и в его отсутствие. По завершении часовой инкубации %TDNA снижался, в пробе «RH-123 + 4 Гр» он достоверно отличался от такового в пробе «RH-123 + 4 Гр_1 ч» ($p = 0.04$) и был сопоставим с контрольным.

Обработка красителем JGB клеток асцитной карциномы Эрлиха вызывает повреждения ядерной ДНК. На рис. 5а показан % TDNA клеток АКЭ, инкубированных с 0.005% JGB. Как видно из этого рисунка, с увеличением времени инкубации увеличивался и % TDNA; все пробы достоверно отличались от контроля ($p < 0.05$). На рис. 5б показан %TDNA клеток АКЭ, облученных в дозе 4 Гр или обработанных JGB. После инкубации с JGB (15 мин, 37°C) клетки были трижды отмыты PBS и инкубированы в течение 1 ч. Видно, что обработка JGB вызывает увеличение % TDNA, сопоставимое с 4 Гр. Пробы «4 Гр» и «JGB_1 ч» достоверно отличались от контроля ($p < 0.05$). При оценке количества мертвых клеток (клеток с поврежденной мембраной) обнаружили, что через 15 мин инкубации с JGB обнаруживалось примерно 45–46% погибших клеток, а через 60 мин — примерно 60%.

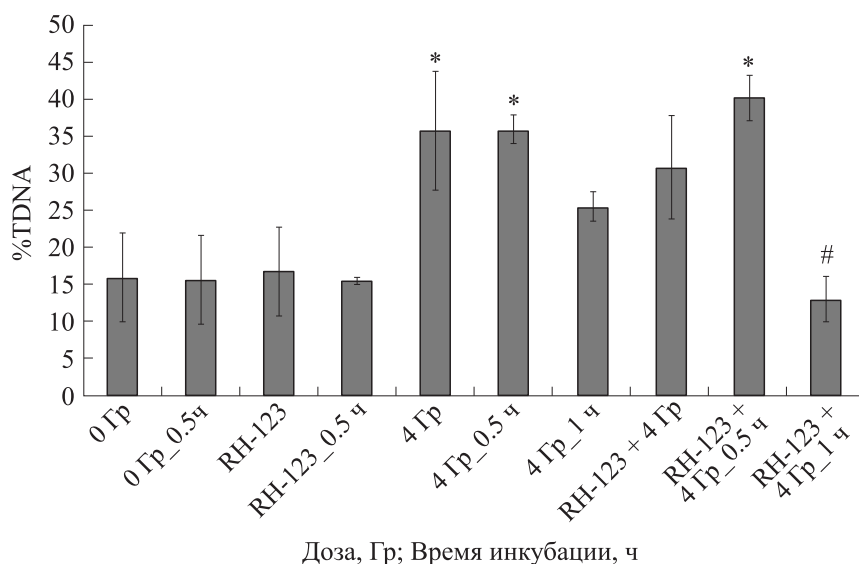


Рис. 4. Уровень повреждений ДНК (%TDNA) клеток АКЭ, обработанных или не обработанных RH-123 и облученных в дозе 4 Гр. Уровень повреждений ДНК в пробах «4 Гр», «4 Гр_0.5 ч» и «RH-123 + 4 Гр_0.5 ч» достоверно отличался от контроля (* – $p = 0.017$, 0.02 и 0.01 соответственно). По завершении часовой инкубации уровень повреждений ДНК в пробе «RH-123 + 4 Гр» достоверно отличался от такового в пробе «RH-123 + 4 Гр_1 ч» (# – $p = 0.04$) и был сопоставим с контрольным уровнем. Приведены средние значения $\pm$ стандартное отклонение ($M \pm SD$).

ОБСУЖДЕНИЕ

Повреждения ДНК являются биологическим индикатором таких процессов, как окислительный стресс, репарация ДНК и клеточная гибель. Как видно из рис. 2 и 3, в результате обработки ротеноном клеток P388 и АКЭ в них регистрировался повышенный уровень повреждений ДНК, что согласуется с литературными данными. Так, на модели астроцитоподобных клеток было показано, что воздействие ротенона приводило к снижению выживаемости, увеличению

уровня свободных радикалов и повреждению ДНК [59]. Очевидно, что увеличение %TDNA в клетках P388 и АКЭ в результате обработки ротеноном обусловлено воздействием АФК. Наблюдаемый %TDNA был сравним с таковым при 4 Гр (рис. 1–3). Основное генотоксическое действие рентгеновского излучения также опосредовано атаками АФК [52]. Если клетки облучали при 0°C, то, в основном, регистрировались индуцированные облучением повреждения ДНК. Если же клетки облучали при комнатной температуре или

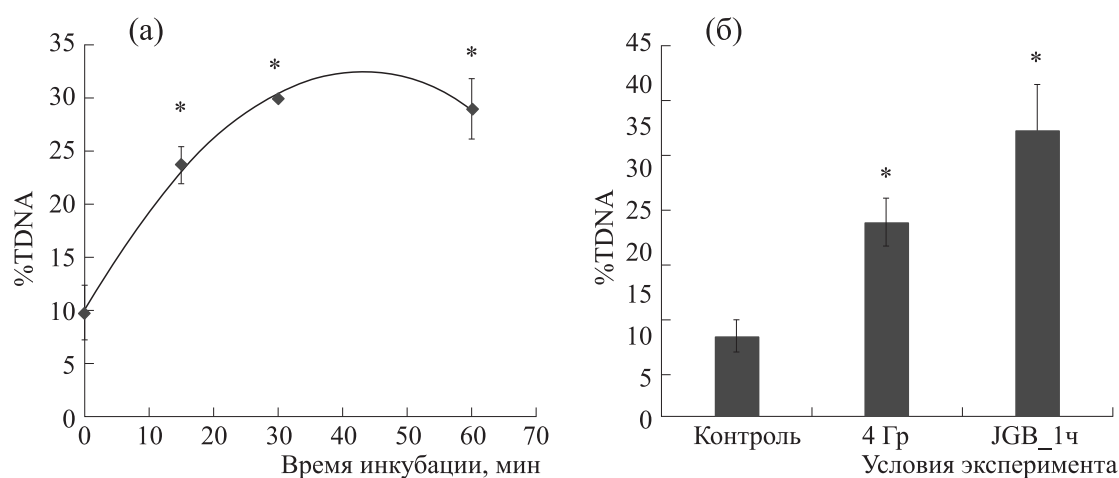


Рис. 5. Уровень повреждений ДНК (% TDNA) клеток асцитной карциномы Эрлиха, обработанных 0.005% JGB (а) или облученных в дозе 4 Гр (б). Клетки в пробе «JGB_1 ч» перед часовой инкубацией были отмыты фосфатно-солевым буфером. Пробы «4 Гр» и «JGB_1 ч» достоверно отличались от контроля (* $p < 0.05$). Приведены средние значения $\pm$ стандартное отклонение ($M \pm SD$).

инкубировали при 37°C после облучения, то в этом случае регистрировались как возникшие в результате облучения или обработки ротеноном повреждения ДНК, так и разрывы, вызванные работой репарационных нуклеаз в эти временные интервалы, что может характеризоваться более высоким %TDNA. Следует отметить, что в облученных клетках АКЭ величина %TDNA при 4 Гр выше, чем в клетках P388. Возможно, это связано как с клеточными различиями, так и с тем, что облучение клеток АКЭ проводили при комнатной температуре, а клеток P388 — на льду. И в клетках P388, облученных на льду, и в клетках АКЭ, облученных при комнатной температуре, по окончании получасового пострadiационного периода наблюдалось уменьшение %TDNA, что может свидетельствовать о репарации индуцированных повреждений ДНК. В обработанных ротеноном и/или облученных клетках P388 и АКЭ регистрировали высокий %TDNA, сравнимый с таковым при 4 Гр, что свидетельствует о том, что последующее за обработкой ротеноном облучение не вызывает заметного увеличения %TDNA. По-видимому, предрадиационная обработка ротеноном препятствует продукции АФК митохондриями в облученной клетке; либо выбранные сроки наблюдений и ограничения метода не позволяют выявить существенный вклад облучения в уровень повреждений ДНК. В процессе пострadiационной инкубации клеток P388 наблюдалась эффективная репарация ДНК, тогда как в клетках АКЭ — лишь тенденция к восстановлению ДНК. Так, получасовая инкубация клеток АКЭ не выявила разницы между пробами «ROT_0.5 ч» и «ROT + 4 Гр_0.5 ч», %TDNA в этих пробах был сопоставим с таковым в пробе «ROT + 4 Гр» (рис. 3). По-видимому, различие в репарации ДНК в обработанных ротеноном и инкубированных после облучения клетках P388 и АКЭ может быть объяснено спецификой этих клеточных линий. Клетки P388 представлены двумя типами клеток, в то время как среди клеток АКЭ различают до 6–7 типов клеток с разным количеством хромосом [60, 61]. Можно полагать, что кратковременное воздействие ротенона вызывало изменение работы митохондрий, которое снижало эффекты воздействия рентгеновского излучения на митохондрии. Возможно также, что либо сам ротенон, окисляясь, либо ротенон-индуцированные кислородные радикалы, взаимодействуя с продуктами радиолитического распада воды, уменьшали уровень радиационно-индуцированных АФК. Эти данные, взятые вместе, могут свидетельствовать о том, что ротенон, нарушая работу митохондрий, способствует сохранению целостности ДНК в облученных клетках.

Известно, что ротенон обладает высокой гидрофобностью и легко проникает через клеточную мембрану без помощи специфических транс-

портных механизмов [1]. RH-123 по молекулярной массе близок к ротенону и, являясь катионным красителем, тоже легко проникает в клетку. Было показано, что RH-123 проникает в клетки в дозозависимой манере и удерживается в клетках (даже после нескольких промывок), также было обнаружено его пролонгированное удерживание в митохондриях ряда трансформированных опухолевых клеточных линий и опухолей [30, 49, 62, 63]. Исходя из приведенных литературных данных, демонстрирующих удерживание этого красителя в разных клетках, в следующих экспериментах клетки АКЭ после обработки RH-123 трижды промывали PBS. Обнаружено, что обработка клеток RH-123 с последующей отмывкой не вызывала увеличения %TDNA как сразу, так и через 30 мин инкубации в PBS. Облучение клеток в дозе 4 Гр вызывало увеличение %TDNA (рис. 4). В этих экспериментах %TDNA облученных клеток АКЭ был выше, чем таковой на рис. 3, что можно объяснить разной средой, в которой облучали эти клетки: на рис. 4 клетки отмывали PBS и облучали в этом же буфере без каких-либо органических добавок, являющихся радиопротектором, как, например, глюкоза в растворе Хенкса. Репарация ДНК также была менее эффективна, заметное снижение %TDNA наблюдалось лишь через 1 ч пострadiационной инкубации. Обработка клеток RH-123 перед облучением не сказывалась на величине %TDNA, однако обнаруживались различия %TDNA в пострadiационном периоде. Исходя из того, что RH-123 пролонгированно удерживается в митохондриях, очевидно, что оставшееся после промывок некоторое количество RH-123 в клетках влияло на уровень повреждений ДНК в пострadiационном периоде: %TDNA в пробе «RH-123 + 4 Гр_0.5 ч» оказался выше, чем в пробе «4 Гр_0.5 ч», хотя достоверные различия между соответствующими величинами %TDNA не были обнаружены. Возможно, что увеличение %TDNA обусловлено не только удержанием красителя в клетках, но и его возможной модификацией, подобно тому, как это было выявлено на обработанных RH-123 клетках глиомы: было обнаружено, что в результате модификаций молекулы родамина возникают флуоресцентные производные с меньшей молекулярной массой; авторы полагают, что длительное удержание красителя и его производных может быть причиной подавления функций митохондрий и, в конечном итоге, гибели клеток [63]. Через 1 ч %TDNA в пробе «RH-123 + 4 Гр_1 ч» был существенно ниже, чем в пробе «4 Гр_1 ч», и был сравним с контрольным, что свидетельствует об эффективной репарации ДНК в клетках, предварительного обработанных RH-123 (рис. 4). Ротенон в клетках P388 также не препятствовал репарации ДНК: %TDNA в пробе «ROT + 4 Гр_0.5 ч» существенно уменьшался по сравнению с «ROT + 4 Гр» и был сравним с кон-

трольным (рис. 2). Можно полагать, что предварительная обработка клеток RH-123, как и в случае обработки клеток ротеноном, нарушая работу митохондрий, способствует сохранению целостности ядерной ДНК в облученных клетках.

JGB также оказывает генотоксическое действие на клетки АКЭ: уже через 15 мин инкубации регистрируется существенное увеличение %TDNA. Уменьшение %TDNA через 1 ч на кривой (рис. 5а), по-видимому, обусловлено потерями фрагментов ДНК и находится за пределами чувствительности метода. В случае, когда обработанные JGB клетки были трижды отмыты PBS и инкубированы в течение 1 ч, наблюдалось увеличение %TDNA, сопоставимое с таковым при 4 Гр. При оценке количества мертвых клеток обнаружили, что уже через 15 мин инкубации с JGB регистрируется большая доля погибших клеток, что свидетельствует о высокой цитотоксичности JGB. Очевидно, что цитотоксичность JGB обусловлена тем, что он взаимодействует со многими клеточными компонентами, существенно нарушая работу различных процессов в клетке. Так, было показано, что JGB может восстанавливаться как в митохондриальной, так и в немитохондриальной частях клетки, он адсорбируется на многих белках и клеточных фракциях, включая коллаген, сывороточный альбумин, митохондрии и ультрамикросомы [36, 64]; кроме того, было показано, что *in vitro* JGB взаимодействует с двуцепочечной ДНК, а также с двуцепочечной поли(А) со значительным нарушением ее вторичной структуры [41, 65]. Таким образом, JGB более генотоксичен/цитотоксичен, чем ротенон и RH-123.

Исходя из представленных результатов, видно, что предварительная обработка клеток ротеноном или RH-123, нарушая работу митохондрий, способствовала сохранению целостности ядерной ДНК в облученных клетках. Воздействие JGB вызывало существенное увеличение %TDNA, сопоставимое с таковым при облучении в дозе 4 Гр, и гибель клеток. Можно полагать, что вызванные этими митохондриальными ингибиторами повреждения ДНК являются разрывами и щелочеллабильными (апуриновыми/апирииминовыми) сайтами в ДНК, поскольку использовался щелочной вариант метода ДНК-комет, позволяющий, как известно [66], регистрировать всю сумму этих повреждений.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают глубокую благодарность сотрудникам Лаборатории окислительного стресса и Лаборатории клеточной инженерии ИТЭБ РАН за предоставление образцов мышинных опухолевых клеток.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена в рамках Государственного задания ИТЭБ РАН (№ 075-00224-24-00 и № 075-00224-24-01).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Работу с животными проводили в соответствии с рекомендациями Комиссии по биологической безопасности и биоэтике ИТЭБ РАН.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Richardson J. R., Fitsanakis V., Westerink R. H. S., and Kanthasamy A. G. Neurotoxicity of pesticides. *Acta Neuropathol.*, **138** (3), 343–362 (2019). DOI: 10.1007/s00401-019-02033-9. PMID: 31197504; PMCID: PMC6826260
2. Sun Z., Xue L., Li Y., Cui G., Sun R., Hu M., and Zhong G. Rotenone-induced necrosis in insect cells via the cytoplasmic membrane damage and mitochondrial dysfunction. *Pestic. Biochem. Physiol.*, **173**, 104801 (2021). DOI: 10.1016/j.pestbp.2021.104801. PMID: 33771250
3. Panov A., Dikalov S., Shalbuyeva N., Taylor G., Sherer T., and Greenamyre J. T. Rotenone model of Parkinson disease: multiple brain mitochondria dysfunctions after short term systemic rotenone intoxication. *J. Biol. Chem.*, **280** (51), 42026–42035 (2005). DOI: 10.1074/jbc.M508628200. PMID: 16243845
4. Li N., Ragheb K., Lawler G., Sturgis J., Rajwa B., Melendez J. A., and Robinson J. P. Mitochondrial complex I inhibitor rotenone induces apoptosis through enhancing mitochondrial reactive oxygen species production. *J. Biol. Chem.*, **278** (10), 8516–8525 (2003). DOI: 10.1074/jbc.M210432200
5. Heo G., Sun M. H., Jiang W. J., Li X. H., Lee S. H., Guo J., Zhou D., and Cui X. S. Rotenone causes mitochondrial dysfunction and prevents maturation in porcine oocytes. *PLoS One*, **17** (11), e0277477 (2022). DOI: 10.1371/journal.pone.0277477
6. Huang Y., Liu X., Feng Y., Nie X., Liu Q., Du X., Wu Y., Liu T., and Zhu X. Rotenone, an environmental toxin, causes abnormal methylation of the mouse brain organoid's genome and ferroptosis. *Int. J. Med. Sci.*, **19** (7), 1184–1197 (2022). DOI: 10.7150/ijms.74569. PMID: 35919817; PMCID: PMC9339416
7. Chen H., Wen Y., Yu Z., Du X., Pan W., and Liu T. Codonopsis pilosula polysaccharide alleviates rotenone-induced murine brain organoids death through down-regulation of gene body DNA methylation modification in the ZIC4/PGM5/CAMTA1 axis. *Biochem. Biophys. Rep.*, **37**, 101593 (2023). DOI: 10.1016/j.bbrep.2023.101593. PMID: 38074999; PMCID: PMC10698575
8. Roy T., Chatterjee A., and Swarnakar S. Rotenone induced neurodegeneration is mediated via cytoskeleton degradation and necroptosis. *Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell. Res.*, **1870** (3), 119417 (2023). DOI: 10.1016/j.bbamcr.2022.119417. PMID: 36581087
9. Pokusa M., Hajdúchová D., Menichová V., Evinová A., Hatoková Z., and Kráľová-Trančíková A. Vulnerability of subcellular structures to pathogenesis induced by ro-

- tenone in SH-SY5Y cells. *Physiol. Res.*, **70** (1), 89–99 (2021). DOI: 10.33549/physiolres.934477
10. Saravanan K. S., Sindhu K. M., and MohanaKumar K. P. Melatonin protects against rotenone-induced oxidative stress in a hemiparkinsonian rat model. *J. Pineal. Res.*, **42** (3), 247–253 (2007). DOI: 10.1111/j.1600-079X.2006.00412.x
 11. Li X. X., He G. R., Mu X., Xu B., Tian S., Yu X., Meng F. R., Xuan Z. H., and Du G. H. Protective effects of baicalein against rotenone-induced neurotoxicity in PC12 cells and isolated rat brain mitochondria. *Eur. J. Pharmacol.*, **674** (2–3), 227–233 (2012). DOI: 10.1016/j.ejphar.2011.09.181. PMID: 21996316
 12. Chernivec E., Cooper J., and Naylor K. Exploring the effect of rotenone—a known inducer of Parkinson’s disease—on mitochondrial dynamics in *Dictyostelium discoideum*. *Cells*, **7** (11), 201 (2018). DOI: 10.3390/cells7110201
 13. Kujawska M., Jourdes M., Kurpiak M., Szulc M., Szafer H., Chmielarz P., Kreiner G., Krajka-Kuźniak V., Mikołajczak P. Ł., Teissedre P. L., and Jodynys-Liebert J. Neuroprotective effects of pomegranate juice against Parkinson’s disease and presence of ellagitannins-derived metabolite-urolithin A. *Brain. Int. J. Mol. Sci.*, **21** (1), 202 (2020). DOI: 10.3390/ijms21010202
 14. Radad K., Al-Shraim M., Al-Emam A., Wang F., Kranner B., Rausch W. D., and Moldzio R. Rotenone: from modelling to implication in Parkinson’s disease. *Folia Neuropathol.*, **57** (4), 317–326 (2019). DOI: 10.5114/fn.2019.89857. PMID: 32337944
 15. Innos J., and Hickey M. A. Using rotenone to model Parkinson’s disease in mice: a review of the role of pharmacokinetics. *Chem. Res. Toxicol.*, **34** (5), 1223–1239 (2021). DOI: 10.1021/acs.chemrestox.0c00522. PMID: 33961406
 16. Guo Z., Ruan Z., Zhang D., Liu X., Hou L., and Wang Q. Rotenone impairs learning and memory in mice through microglia-mediated blood brain barrier disruption and neuronal apoptosis. *Chemosphere*, **291** (Pt 2), 132982 (2022). DOI: 10.1016/j.chemosphere.2021.132982. PMID: 34822863
 17. Zhang J., Sun B., Yang J., Chen Z., Li Z., Zhang N., Li H., and Shen L. Comparison of the effect of rotenone and 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine on inducing chronic Parkinson’s disease in mouse models. *Mol. Med. Rep.*, **25** (3), 91 (2022). DOI: 10.3892/mmr.2022.12607. PMID: 35039876; PMCID: PMC8809117
 18. Heinz S., Freyberger A., Lawrenz B., Schladt L., Schmuck G., and Ellinger-Ziegelbauer H. Inhibitor rotenone in the context of pharmacological and safety evaluation. *Sci. Rep.*, **7**, 45465 (2017). DOI: 10.1038/srep45465
 19. Wu M., Chen W., Zhang S., Huang S., Zhang A., Zhang Y., and Jia Z. Rotenone protects against β -cell apoptosis and attenuates type 1 diabetes mellitus. *Apoptosis*, **24** (11–12), 879–891 (2019). DOI: 10.1007/s10495-019-01566-4. PMID: 31485878
 20. Callender L. A., Carroll E. C., Bober E. A., Akbar A. N., Solito E., and Henson S. M. Mitochondrial mass governs the extent of human T cell senescence. *Aging Cell.*, **19** (2), e13067 (2020). DOI: 10.1111/accel.13067. PMID: 31788930; PMCID: PMC6996952
 21. Baracca A., Sgarbi G., Solaini G., and Lenaz G. Rhodamine 123 as a probe of mitochondrial membrane potential: evaluation of proton flux through F(0) during ATP synthesis. *Biochim. Biophys. Acta.*, **1606** (1–3), 137–146 (2003). DOI: 10.1016/s0005-2728(03)00110-5. PMID: 14507434
 22. Chazotte B. Labeling mitochondria with rhodamine 123. *Cold Spring Harb. Protoc.*, **7**, 892–894 (2011). DOI: 10.1101/pdb.prot5640. PMID: 21724815
 23. Johnson L. V., Walsh M. L., and Chen L. B. Localization of mitochondria in living cells with rhodamine 123. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **77** (2), 990–994 (1980).
 24. Bertonecello I., and Williams B. Hematopoietic stem cell characterization by Hoechst 33342 and rhodamine 123 staining. *Methods Mol. Biol.*, **263**, 181–200 (2004). DOI: 10.1385/1-59259-773-4:181. PMID: 14976367
 25. Lo K. C., Brugh V. M., III, Parker M., and Lamb D. J. Isolation and Enrichment of Murine Spermatogonial Stem Cells Using Rhodamine 123 Mitochondrial Dye. *Biology of Reproduction*, **72** (3), 767–771 (2005). DOI: 10.1095/biolreprod.104.033464
 26. McKenzie J. L., Takenaka K., Gan O. I., Doedens M., and Dick J. E. Low rhodamine 123 retention identifies long-term human hematopoietic stem cells within the Lin-CD34+CD38- population. *Blood*, **109** (2), 543–545 (2007). DOI: 10.1182/blood-2006-06-030270. PMID: 16990597
 27. Forster S., Thumser A. E., Hood S. R., and Plant N. Characterization of rhodamine-123 as a tracer dye for use in *in vitro* drug transport assays. *PLoS One*, **7** (3), e33253 (2012). DOI: 10.1371/journal.pone.003325
 28. Bao X., Lu S., Liow J. S., Morse C. L., Anderson K. B., Zoghbi S. S., Innis R. B., and Pike V. W. [¹⁴C]Rhodamine-123: synthesis and biodistribution in rodents. *Nucl. Med. Biol.*, **39** (8), 1128–1136 (2012). DOI: 10.1016/j.nucmedbio.2012.06.013. PMID: 22898316; PMCID: PMC3478417
 29. Daoud R., Kast C., Gros P., and Georges E. Rhodamine 123 binds to multiple sites in the multidrug resistance protein (MRP1). *Biochemistry*, **39** (50), 15344–15352 (2000). DOI: 10.1021/bi0020574. PMID: 11112520
 30. Jones L. W., Narayan K. S., Shapiro C. E., and Sweatman T. W. Rhodamine-123: therapy for hormone refractory prostate cancer, a phase I clinical trial. *J. Chemother.*, **17** (4), 435–440 (2005). DOI: 10.1179/joc.2005.17.4.435. PMID: 16167524
 31. Lacerda S. H., Abraham B., Stringfellow T. C., and Indig G. L. Photophysical, photochemical, and tumor-selectivity properties of bromine derivatives of rhodamine-123. *Photochem. Photobiol.*, **81** (6), 1430–1438 (2005). DOI: 10.1562/2005-08-05-RA-639. PMID: 16149863
 32. Bhattarai N., Chen M., Pérez R. L., Ravula S., Strongin R. M., McDonough K., and Warner I. M. Comparison of chemotherapeutic activities of rhodamine-based GUMBOS and nanoGUMBOS. *Molecules*, **25** (14), 3272 (2020). DOI: 10.3390/molecules25143272. PMID: 32709149; PMCID: PMC7397155
 33. Biswas S., Dodwadkar N. S., Sawant R. R., Koshkaryev A., and Torchilin V. P. Surface modification of liposomes with rhodamine-123-conjugated

- polymer results in enhanced mitochondrial targeting. *J. Drug Target*, **19** (7), 552–561 (2011). DOI: 10.3109/1061186X.2010.536983. PMID: 21348804; PMCID: PMC3492939
34. Lampidis T. J., Bernal S. D., Summerhayes I. C., and Chen L. B. Selective toxicity of rhodamine 123 in carcinoma cells *in vitro*. *Cancer Res.*, **43** (2), 716–720 (1983). PMID: 6848187
 35. Mani S., Swargiary G., and Singh K. K. Natural agents targeting mitochondria in cancer. *Int. J. Mol. Sci.*, **21** (19), 6992 (2020). DOI: 10.3390/ijms21196992. PMID: 32977472; PMCID: PMC7582837
 36. Lazarow A. and Cooperstein S. J. Studies on the enzymatic basis for the janus green b staining reaction. *J. Histochem. Cytochem.*, **1**, 234 (1953). DOI: 10.1177/1.4.234
 37. Smith V. A., and Johnson T. K. Identification and evaluation of a thinning agent compatible with MegaCell DCS, an animal product-free corneal storage medium. *Graefes Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.*, **250** (12), 1777–1786 (2012). DOI: 10.1007/s00417-012-2126-1. PMID: 23011001; PMCID: PMC3501186
 38. Ahmad F., Alamoudi W., Haque S., Salahuddin M., and Alsamman K. Simple, reliable, and time-efficient colorimetric method for the assessment of mitochondrial function and toxicity. *Bosn. J. Basic. Med. Sci.*, **18** (4), 367–374 (2018). DOI: 10.17305/bjbm.2018.3323. PMID: 29984676; PMCID: PMC6252094
 39. Alamoudi W. A., Ahmad F., Acharya S., Haque S., Alsamman K., Herzallah H. K., and Al-Otaibi S. T. A simplified colorimetric method for rapid detection of cell viability and toxicity in adherent cell culture systems. *J. BUON*, **23** (5), 1505–1513 (2018). PMID: 30570879
 40. Daw S., and Law S. Quercetin induces autophagy in myelodysplastic bone marrow including hematopoietic stem/progenitor compartment. *Environ. Toxicol.*, **36** (2), 149–167 (2021). DOI: 10.1002/tox.23020. PMID: 32902906
 41. Huang C. Z., Li Y. F., Huang X. H., and Li M. Interactions of Janus Green B with double stranded DNA and the determination of DNA based on the measurement of enhanced resonance light scattering. *Analyst.*, **125** (7), 1267–1272 (2000). DOI: 10.1039/b001662o. PMID: 10984922
 42. Lee B. C., Yoo J. S., Baik K. Y., Kim K. W., and Soh K. S. Novel threadlike structures (Bonghan ducts) inside lymphatic vessels of rabbits visualized with a Janus Green B staining method. *Anat. Rec. B. New Anat.*, **286** (1), 1–7 (2005). DOI: 10.1002/ar.b.20076. PMID: 16177995
 43. Yang J., Ma L., Zhang Y., Fang F., and Li L. Flow cytometric identification of two different rhodamine-123-stained mitochondrial populations in maize leaves. *Protoplasma*, **231** (3–4), 249–252 (2007). DOI: 10.1007/s00709-007-0259-6. PMID: 17922268
 44. Zheng Y., Li H., Manole C. G., Sun A., Ge J., and Wang X. Telocytes in trachea and lungs. *J. Cell. Mol. Med.*, **15** (10), 2262–2268 (2011). DOI: 10.1111/j.1582-4934.2011.01404.x. PMID: 21810171; PMCID: PMC4394233
 45. Lee B. C. Evidence for novel tubular-bundle structures entangled in the fascia of the inner abdominal wall of a rat. *Micron*, **123**, 102681 (2019). DOI: 10.1016/j.micron.2019.102681. PMID: 31121482.
 46. Gozar M. M., O'Sullivan W. J., and Bagnara A. S. Mitochondrial function in *Babesia bovis*. *Int. J. Parasitol.*, **22** (2), 165–171 (1992). DOI: 10.1016/0020-7519(92)90097-5. PMID: 1587679
 47. Vennerstrom J. L., Makler M. T., Angerhofer C. K., and Williams J. A. Antimalarial dyes revisited: xanthenes, azines, oxazines, and thiazines. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **39** (12), 2671–2677 (1995). DOI: 10.1128/AAC.39.12.2671. PMID: 8593000; PMCID: PMC163010
 48. Menon T. and Ponnuvel K. M. Disc diffusion test in the identification of *Candida* species. *Mycoses*, **43** (5), 165–168 (2000). DOI: 10.1046/j.1439-0507.2000.00566.x. PMID: 10948812
 49. Summerhayes I. C., Lampidis T. J., Bernal S. D., Nadakavukaren J. J., Nadakavukaren K. K., Shepherd E. L., and Chen L. B. Unusual retention of rhodamine 123 by mitochondria in muscle and carcinoma cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **79** (17), 5292–5296 (1982). DOI: 10.1073/pnas.79.17.5292. PMID: 6752944; PMCID: PMC346882
 50. Gupta R. S., and Dudani A. K. Species-specific differences in the toxicity of rhodamine 123 towards cultured mammalian cells. *J. Cell Physiol.*, **130** (3), 321–327 (1987). DOI: 10.1002/jcp.1041300303. PMID: 3558490
 51. Ghazi-Khansari M., Mohammadi-Bardbori A., and Hosseini M. J. Using Janus green B to study paraquat toxicity in rat liver mitochondria: role of ACE inhibitors (thiol and nonthiol ACEi). *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **1090**, 98–107 (2006). DOI: 10.1196/annals.1378.010. PMID: 17384251
 52. Azzam E. I., Jay-Gerin J. P., and Pain D. Ionizing radiation-induced metabolic oxidative stress and prolonged cell injury. *Cancer Lett.*, **327** (1–2), 48–60 (2012). DOI: 10.1016/j.canlet.2011.12.012. PMID: 22182453
 53. Kumari S., Badana A. K., G M. M., G S., and Malla R. Reactive oxygen species: a key constituent in cancer survival. *Biomark. Insights*, **13**, 1177271918755391 (2018). DOI: 10.1177/1177271918755391. PMID: 29449774; PMCID: PMC5808965
 54. Kobashigawa S., Suzuki K., and Yamashita S. Ionizing radiation accelerates Drp1-dependent mitochondrial fission, which involves delayed mitochondrial reactive oxygen species production in normal human fibroblast-like cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **414** (4), 795–800 (2011).
 55. Collins A. R., Oscoz A. A., Brunborg G., Gaivão I., Giovannelli L., Kruszewski M., Smith C. C., and Stetina R. The comet assay: topical issues. *Mutagenesis*, **23** (3), 143–151 (2008). DOI: 10.1093/mutage/gem051. PMID: 18283046
 56. Кондратьева И. А., Воробьева Н. В., Буракова О. В., Фрезе К. В., Егорова С. К., Мойсенович М. М., Киркин А. Ф., Пинегин Б. В., Симонова А. В., Киташов А. В., и Рокк Ф. *Практикум по иммунологии*, под ред. И. А. Кондратьевой и В. Д. Самуилова (Изд-во МГУ, М., 2001).

57. Chemeris N. K., Gapeyev A. B., Sirota N. P., Gudkova O. Y., Kornienko N. V., Tankanag A. V., Konovalov I. V., Buzoverya M. E., Suvorov V. G., and Logunov V. A. DNA damage in frog erythrocytes after in vitro exposure to a high peak-power pulsed electromagnetic field. *Mutat. Res.*, **558** (1–2), 27–34 (2004).
58. Lovell D. P., and Omori T. Statistical issues in the use of the comet assay. *Mutagenesis*, **23** (3), 171–182 (2008).
59. Swarnkar S., Singh S., Goswami P., Mathur R., Patro I. K., and Nath C. Astrocyte activation: a key step in rotenone induced cytotoxicity and DNA damage. *Neurochem. Res.*, **37** (10), 2178–2189 (2012). DOI: 10.1007/s11064-012-0841-y. PMID: 22846965
60. Трещалина Е. М. Коллекция опухолевых штаммов животных для экспериментальной химиотерапии злокачественных опухолей (Практическая медицина, М., 2022).
61. Лысенко Ю. А., Косых И. А., Шабанов Д. И., Ви-рютина В. В., Артюхов В. Г. Жизнеспособность клеток асцитной карциномы Эрлиха на различных стадиях роста опухоли в условиях фотодинамического воздействия. *Вестн. ВГУ, сер.: Химия. Биология. Фармация*, **2**, 120–125 (2013).
62. Darzynkiewicz F., Traganos L., Staiano-Coico J., and Kapuscinski M. R. Melamed interactions of rhodamine 123 with living cells studied by flow cytometry. *Cancer Res.*, **42**, 799–806 (1982). PMID: 7059978
63. Zorova L. D., Demchenko E. A., Korshunova G. A., Tashlitsky V. N., Zorov S. D., Andrianova N. V., Popkov V. A., Babenko V. A., Pevzner I. B., Silachev D. N., Plotnikov E. Y., and Zorov D. B. Is the Mitochondrial Membrane Potential ($\Delta\Psi$) Correctly assessed? Intracellular and intramitochondrial modifications of the $\Delta\Psi$ probe, rhodamine 123. *Int. J. Mol. Sci.*, **23** (1), 482 (2022). DOI: 10.3390/ijms23010482. PMID: 35008907; PMCID: PMC8745654
64. Urata M. Janus Green B causing functional disturbances in mitochondria in Mg^{2+} -containing medium. *Cell structure and function*, **2**, 29–39 (1977).
65. Khan A. Y., Saha B., and Kumar G. S. Interaction of phenazinium dyes with double-stranded poly(A): spectroscopy and isothermal titration calorimetry studies. *Spectrochim. Acta A. Mol. Biomol. Spectrosc.*, **131**, 615–624 (2014). DOI: 10.1016/j.saa.2014.04.087. PMID: 24861262
66. Olive P., and Banáth J. The comet assay: a method to measure DNA damage in individual cells. *Nat. Protoc.*, **1**, 23–29 (2006). DOI: 10.1038/nprot.2006.5

Rotenone, Rhodamine 123 and Janus Green Induce Damage to Nuclear DNA in Ascites Tumor Cells from Mice, Rotenone and Rhodamine in X-Irradiated Cells Contribute to the Maintenance of Genome Integrity

E.A. Kuznetsova*, and N.P. Sirota*

*Institute of Theoretical and Experimental Biophysics, Russian Academy of Sciences,
Institutskaya ul. 3, Pushchino, Moscow Region, 142290 Russia

Rotenone, Rhodamine 123, and Janus green B, inhibitors of mitochondria function, are currently investigated to create pharmacological agents that induce mitochondrial dysfunction and apoptosis. Since impaired mitochondrial function is associated with overproduction of reactive oxygen species, it seems relevant to compare DNA damage induced by the said inhibitors in Ehrlich ascites carcinoma cells and murine lymphocytic leukemia P388 and DNA damage induced by the direct effect of ionizing radiation (X-rays) that induces an increase of reactive oxygen species. The alkaline comet assay was used for measuring the level of DNA damage. The level of Rotenone-induced DNA damage was comparable to that one induced by very low-dose radiation (4 Gy) for both cell types. Post-irradiation incubation of cells led to a reduction in the level of DNA damage, indicating that damage to DNA is repaired. Treatment of Ehrlich ascites carcinoma cells with Rhodamine 123 and subsequent washing them for removal of excess dye did not cause an increase in the level of DNA damage, however, exposure to very low dose radiation (4 Gy) in the presence of Rhodamine 123 induced an increase in the level of DNA damage, which was significantly reduced after 1-hour incubation. It can be assumed that pre-treatment of cells with Rotenone or Rhodamine 123 that disrupt mitochondrial function contributed to the maintenance of the integrity of nuclear DNA in irradiated cells. Exposure to Janus green B caused an increase in the level of DNA damage and cell death. The alkaline comet assay revealed that damage induced by these compounds can be considered single- and double-strand breaks and alkali-labile (apurinic/apyrimidinic) sites in DNA.

Keywords: Ehrlich ascites carcinoma, murine lymphocytic leukemia P388, Rotenone, Rhodamine 123, Janus green B, comet assay