

ФАРМАКОГЕНЕТИКА

ИЗУЧЕНИЕ ГЕНОТОКСИЧЕСКИХ СВОЙСТВ ДОКСОРУБИЦИНА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ КЛЕТОЧНОЙ МОДЕЛИ *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*

Ю. В. Саенко, А. М. Шутов¹

Изучена зависимость между проявлением генотоксического эффекта доксорубина, оцениваемого по степени активации гена рибонуклеотидредуктазы-3, и оксидативным стрессом с использованием *Saccharomyces cerevisiae* в качестве клеточной эукариотической модели. Доксорубин вызывал зависящее от дозы снижение темпов клеточной пролиферации, повышение внутриклеточной концентрации ГSH и GSSG, не влиял на содержание малонового диальдегида. Степень экспрессии гена рибонуклеотидредуктазы-3 увеличивалась в присутствии доксорубина, но не зависела от концентрации. Таким образом, доксорубин увеличивает экспрессию гена рибонуклеотидредуктазы-3 и как следствие вызывает рост внутриклеточной концентрации ГSH. Рост концентрации GSSG вероятно свидетельствует о развитии оксидативного стресса, что, однако, не сопровождается увеличением концентрации МДА в клетках *S. cerevisiae*.

Ключевые слова: доксорубин, генотоксичность, рибонуклеотидредуктаза, оксидативный стресс, глутатион, дрожжи

ВВЕДЕНИЕ

Антипролиферативные и цитотоксические механизмы действия антрациклиновых антибиотиков, в частности доксорубина (ДОК), остаются неясными [9]. Существует несколько мнений, объясняющих действие доксорубина на нормальные и опухолевые клетки: предполагается генотоксическое действие доксорубина, индукция ДОК оксидативного стресса, влияние ДОК на внутриклеточный гомеостаз железа [15]. Одним из основных механизмов токсического действия ДОК является его ДНК-повреждающее действие. Однако до сих пор остается не ясно инициирует ли сам ДОК повреждение ДНК или генотоксический эффект является следствием оксидативного стресса, вызванного ДОК [5].

Перспективной моделью для изучения внутриклеточных сигнальных механизмов являются одноклеточные эукариотические организмы — *Saccharomyces cerevisiae* [10]. Это связано с тем, что многие внутриклеточные метаболические, генетические и сигнальные механизмы в общих чертах схожи у большинства эукариотических клеток различных видов. Кроме того, дрожжи уже успешно использовались для изучения токсических эффектов лекарственных средств, в том числе и антрациклиновых антибиотиков [4].

Перспективным подходом к изучению генотоксичности с применением эукариотических модельных ор-

ганизмов является использование особых генетических конструкций, в которых промотор определенного гена сцеплен с ферментом β-галактозидазы (LacZ). Одной из таких конструкций, применяемых для изучения генотоксического действия веществ, является RNR3-LacZ, в которой промотор гена рибонуклеотидредуктазы-3 (RNR3), кодирующий большую субъединицу рибонуклеотидредуктазы, сцеплен с геном β-галактозидазы [13]. Известно, что в ответ на повреждение ДНК активируется ряд генов, в том числе и ген RNR3, причем в большей степени, чем гены, кодирующие другие субъединицы рибонуклеотидредуктазы [19].

Целью работы явилось изучение зависимости между проявлением генотоксического эффекта различных концентраций доксорубина, оцениваемого по степени активации гена RNR3, и степени оксидативного стресса с использованием *Saccharomyces cerevisiae* в качестве клеточной эукариотической модели.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В исследовании использовали штамм YPH499 (MATα, ura3-52, lys2-801, ade2-101, trp1-delta63, his3-delta200, leu2-delta1). Плазмиду pZZ2 (YCp, URA3, RNR3-LacZ) получили от S. J. Elledge (Центр геномики и протеомики, Гарвардская школа медицины, Бостон, США) [19].

Инкубацию клеток с различными концентрациями ДОК проводили в течение 24 ч при 25 °С в минимальной синтетической среде без урацила. Проводили минимум 5 опытов с одной и той же концентрацией ДОК. Инкубацию осуществляли на качалке (250 об/мин) в круглодонных колбах объемом 250 мл, объем среды —

¹ Кафедра фармакологии с курсом клинической фармакологии (зав. — проф. А. М. Шутов), кафедра терапии и профессиональных болезней Ульяновского государственного университета, Ульяновск, 432700, ул. Л. Толстого, 42.

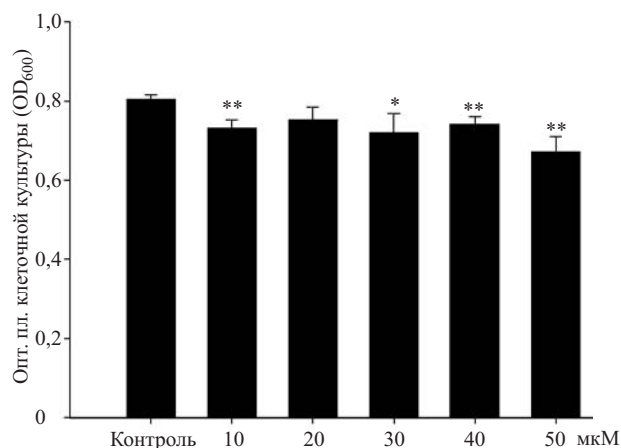


Рис. 1. Клеточная пролиферация *S. cerevisiae*, инкубированных в среде с разной концентрацией доксорубина.

Здесь и на рис. 2 и 3 по оси абсцисс — концентрация доксорубина, мкМ. * — $p < 0,05$, ** — $p < 0,01$.

30 мл. Начальная концентрация клеток во всех опытах была одинаковой и составляла $OD_{600} = 0,3$. Для определения степени клеточной пролиферации определяли оптическую плотность клеток при 600 нм (OD_{600}) [12].

Трансформацию клеток осуществляли с использованием ацетата лития по методу R. D. Gietz [8].

Определение активности β -галактозидазы проводилось с использованием о-нитрофенилгалактопиранозиды в качестве субстрата и выражали в единицах Миллера [11].

Концентрацию малонового диальдегида определяли в тесте с тиобарбитуровой кислотой по методу Л. Б. Андреевой и выражали в мкМ/мг сухой клеточной массы [1].

Для определения концентрации восстановленного глутатиона (GSH) и окисленного глутатиона (GSSG) клетки отмывали от среды и суспендировали в равном объеме 0,1 М фосфатного буфера (pH 7,0). Клеточную суспензию лизировали при нагревании до 95 – 100 °С в течение 90 сек и центрифугировали при 3000 g в течение 5 мин. Половину объема полученного лизата брали для определения GSH, вторую часть оставляли для определения суммарного значения GSH+GSSG. GSH определяли в реакции с 5,5'-дитио-бис-нитробензойной кислотой (ДНТБ). Оптическую плотность измеряли через 15 мин при длине волны 412 нм [7]. Суммарную концентрацию GSH + GSSG определяли после инкубации оставшегося 0,5 объема лизата в присутствии 1 U/мл глутатионредуктазы и 300 мкМ НАДФН₂ в реакции с ДНТБ. Перед добавлением ДНТБ из раствора удаляли глутатион редуктазу путем осаждения трихлоруксусной кислотой. Концентрацию GSSG находили как разницу между суммарной концентрацией GSH + GSSG и концентрацией GSH. Количество GSH и GSSG выражали в $mM \cdot 10^7$ клеток. Для этого перед лизисом клеток определяли их оптическую плотность при 600 нм. При оптической плотности $OD_{600} = 1,0$

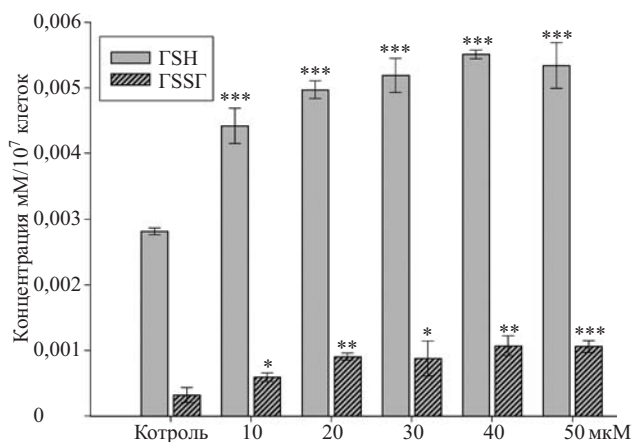


Рис. 2. Содержание GSH и GSSG в клетках *S. cerevisiae*, инкубированных в среде с разной концентрацией доксорубина.

*** — $p < 0,001$. Остальные обозначения те же, что на рис. 1.

($L = 1$ см) количество клеток принимали равным $1 \cdot 10^7$ [12].

Результаты обработаны статистически с использованием критерия Стьюдента для парных переменных. Показатели представлены как $M \pm SD$. Различия между группами считали достоверными при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

На рис. 1 представлена зависимость клеточной пролиферации от концентрации ДОК. Концентрации ДОК были подобраны таким образом, чтобы, с одной стороны, самая низкая концентрация соответствовала дозам применяющимся в клинике, а, с другой — самая высокая концентрация вызывала видимое замедление клеточной пролиферации в данной эукариотической модели. Как видно из графика, ДОК вызывал достоверное снижение темпов клеточной пролиферации при концентрациях от 10 до 50 мкМ. Таким образом доксорубин проявлял цитостатический эффект в отношении клеток *S. cerevisiae*.

На рис. 2 отображено влияние различных концентраций ДОК на концентрацию GSH и GSSG. Доксорубин вызывал рост концентрации GSH на 35 – 95 %. Подобный эффект влияния ДОК на концентрацию GSH был также обнаружен и в опытах с культурами клеток млекопитающих [16].

Одновременно с ростом концентрации GSH отмечался достоверный рост концентрации GSSG на 60 – 330 %. Отношение GSH/GSSG с ростом концентрации ДОК снижалось. Так, в контрольных экспериментах этот показатель составлял $7,33 \pm 0,28$, тогда как в экспериментах с 10, 20, 30, 40, 50 мкМ ДОК отношение GSH/GSSG составляло $7,52 \pm 1,08$ ($p > 0,05$); $5,51 \pm 0,46$ ($p < 0,01$); $6,38 \pm 2,39$ ($p > 0,05$); $5,19 \pm 0,63$ ($p < 0,01$) и $5,05 \pm 0,70$ ($p < 0,01$) соответственно. Таким образом, несмотря на рост концентрации GSH в ответ на увеличение концентрации ДОК, отношение GSH/GSSG уменьшалось. Это свидетельст-

вует о снижении окислительно-восстановительного потенциала, что может указывать на развитие оксидативного стресса [14]. При этом в наших экспериментах не было выявлено статистически достоверных различий в содержании малонового диальдегида между интактными клетками и клетками, пролиферирующими в присутствии ДОК. В контрольной группе концентрация малонового диальдегида составляла $0,009 \pm 0,003$ мкМ/мг сухой клеточной массы, тогда как при инкубации клеток с 10, 20, 30, 40 и 50 мкМ ДОК аналогичный показатель составлял $0,013 \pm 0,003$; $0,013 \pm 0,003$; $0,008 \pm 0,002$; $0,011 \pm 0,002$ и $0,009 \pm 0,003$ мкМ/мг сухой клеточной массы соответственно.

Степень генотоксического эффекта доксорубина мы оценивали с помощью генетической конструкции RNR3-LacZ, которая была включена в низкокопийную плазмиду pZ22. В генетической конструкции RNR3-LacZ промотор гена рибонуклеотидредуктазы-3 сцеплен с ферментом β-галактозидазы. Это дает возможность по величине активности β-галактозидазы судить о степени экспрессии гена рибонуклеотидредуктазы-3 и тем самым оценить генотоксический эффект [13].

В ответ на увеличение концентрации ДОК в ростовой среде наблюдали достоверное увеличение активности фермента β-галактозидазы при всех изученных концентрациях ДОК. Увеличение активности β-галактозидазы не зависело от концентрации ДОК. Так, наибольшая активность β-галактозидазы и наибольшая экспрессия гена рибонуклеотидредуктазы-3 наблюдалась при концентрации ДОК в ростовой среде, равной 20 мкМ, а минимальная — при концентрации ДОК 40 мкМ (рис. 3).

Один из основных механизмов цитотоксичности ДОК связан с его редоксциклической активностью. В основе этого механизма лежит способность ДОК принимать электрон и восстанавливаться до семихинона [17]. Доксорубин в форме семихинона является свободным радикалом и способен восстанавливать кислород до супероксиданионрадикала. В ходе реакции с кислородом, кроме супероксиданионрадикала, генерируется исходная форма доксорубина (т.е. хинон). Ряд флавиновых редуктаз (цитохром-P-450 редуктаза, цитохром b₅-редуктаза, НАДН-дегидрогеназа, ксантиноксидаза) могут способствовать восстановлению ДОК до семихинона, т.е. осуществлять одноэлектронное восстановление [15]. Такие свойства ДОК делают возможным повреждение ДНК либо непосредственно свободными радикалами, либо их продуктами. Повреждение ДНК доксорубином выражается в росте окисленных форм пиримидиновых и пуриновых оснований, которые обладают мутагенным потенциалом и приводят к трансверсиям нуклеотидов [5].

В нашей работе для оценки степени повреждения ДНК использован показатель экспрессии гена рибо-

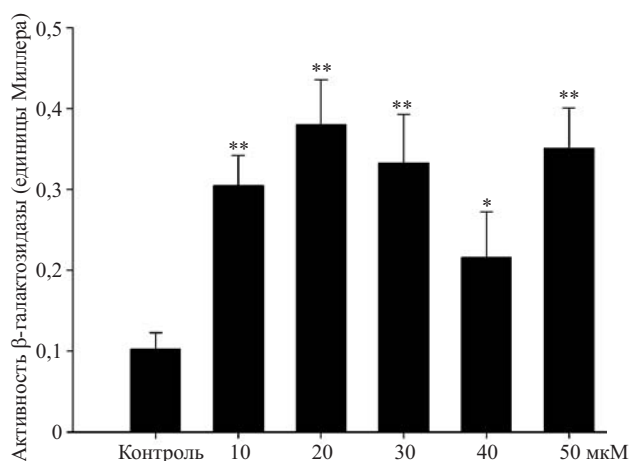


Рис. 3. Величина экспрессии гена RNR3, выражаемая через активность β-галактозидазы, в клетках *S. cerevisiae*, инкубированных в среде с разной концентрацией доксорубина.

Обозначения те же, что на рис. 1.

нуклеотидредуктазы-3, который кодирует большую субъединицу фермента рибонуклеотидредуктазы [3]. В присутствии ДНК-повреждающих агентов величина экспрессии RNR3 увеличивается в 100 – 500 раз [19].

Полученные данные свидетельствуют, что экспрессия RNR3 не зависела от дозы ДОК — достигнув максимума при 20 мкМ, степень экспрессии RNR3 снижалась при дальнейшем росте концентрации ДОК. Такой эффект можно объяснить тем, что при повышении концентрации ДОК становится заметным снижение темпов клеточной пролиферации, а, как известно, повреждение ДНК интенсивнее в активно растущих и делящихся клетках [15]. Таким образом, можно сделать вывод, что доксорубин вызывает повреждение ДНК.

Увеличение экспрессии RNR3 происходило на фоне увеличения концентрации GSH. Факт роста концентрации GSH в ответ на добавление в ростовую среду ДОК не является необычным и уже отмечался в экспериментах на культурах эукариотических клеток [16]. Кроме того, фермент рибонуклеотидредуктаза восстанавливает рибозу до дезоксирибозы, используя при этом в качестве доноров водорода глутаредоксин и тироредоксин. Глутаредоксин, окисляясь в реакции восстановления рибонуклеотидов, сам восстанавливается за счет окисления GSH [3].

В процессе репарации ДНК также необходимы дополнительные количества рибозы, которая синтезируется в ходе реакций пентозофосфатных путей. Кроме образования рибозы, в ходе реакций пентозофосфатных путей происходит также восстановление двух молекул НАДФ⁺ до НАДФН₂, что также может повлиять на увеличение концентрации GSH [18]. Таким образом, увеличение экспрессии генов рибонуклеотидредуктазы может сопровождаться увеличением концентрации GSH.

Однако наши данные не согласуются с многочисленными фактами, свидетельствующими о снижении концентрации GSH в ответ на введение ДОК. В частности, в предыдущих работах мы отмечали, что в ответ на введение ДОК крысам происходит снижение концентрации GSH в почках [2]. Этот факт можно объяснить особенностями культивирования *S. cerevisiae*. Используемая нами в экспериментах среда содержала 2 % глюкозы и обеспечивала клетки глюкозой в неограниченном количестве. Поскольку окисление глюкозы является единственным источником НАДФН₂ для клетки и, следовательно, восстановленных эквивалентов в виде GSH, то потребности клеток *S. cerevisiae* в GSH удовлетворялись в полном объеме. Однако в многоклеточном организме существуют ситуации, когда клетки испытывают дефицит в глюкозе. По нашему мнению, этим можно объяснить расхождение данных, полученных с использованием эукариотической клеточной модели *S. cerevisiae*, с результатами исследований на животных.

Зависимый от концентрации ДОК рост концентрации GSSG (рис. 2), скорее всего связан с редокс-циклическими реакциями ДОК [15], однако одновременное увеличение концентрации GSH, по-видимому, препятствует дальнейшему развитию процессов окислительного стресса, а именно, инициации перекисного окисления биомолекул. В пользу этого предположения говорит тот факт, что нами не было обнаружено роста концентрации МДА при инкубации клеток *S. cerevisiae* с доксорубицином. Этот факт свидетельствует в пользу того, что ДНК-повреждающее действие ДОК не связано с продуктами перекисного окисления биомолекул.

Таким образом, доксорубин увеличивает экспрессию гена RNR3 и как следствие вызывает рост внутриклеточной концентрации GSH. Рост концентрации GSSG, вероятно, свидетельствует о развитии окислительного стресса, что, однако, не сопровождается увеличением концентрации МДА в клетках *S. cerevisiae*. Значение продуктов перекисного окисления биомолекул в повреждении доксорубицином молекул ДНК требует дальнейшего уточнения. Генотоксический эффект доксорубина (ДОК), оцениваемый через экспрессию гена RNR3, по крайней мере частично, вызван повреждением ДНК свободнорадикальными

молекулами, образующимися в результате редокс-циклических реакций ДОК.

ВЫВОДЫ

1. Доксорубин увеличивает экспрессию гена рибонуклеотидредуктазы-3 и как следствие вызывает рост внутриклеточной концентрации GSH в клетках *S. cerevisiae*.

2. Рост концентрации GSSG свидетельствует о развитии начальных этапов окислительного стресса, что, однако, не сопровождается увеличением концентрации конечных продуктов перекисного окисления в клетках *S. cerevisiae*.

3. Генотоксические эффекты доксорубина не связаны с продуктами перекисного окисления биомолекул.

ЛИТЕРАТУРА

1. А. И. Андреева, *Лаб. дело*, **41**, 41 – 46 (1988).
2. Ю. В. Саенко, С. М. Напалкова, А. М. Шутов и др., *Экспер. и клин. фармакол.*, **6**, 52 – 54 (2005).
3. E. S. J. Arner and A. Holmgren, *Eur. J. Biochem.*, **267**, 6102 – 6109 (2000).
4. A. Buschini, P. Poli, and C. Rossi, *Mutagenesis*, **18**, 26 – 36 (2003).
5. J. H. Doroshov, T. W. Synold, G. Somlo, et al., *Blood*, **97**, 2839 – 2845 (2001).
6. S. J. Elledge and R. W. Davis, *Genes Dev.*, **4**, 740 – 751 (1990).
7. G. L. Ellman, *Arch. Biochem. Biophys.*, **82**, 70 – 77 (1972).
8. R. D. Gietz and R. A. Methods in: *Enzymology*, **350**, 87 – 96 (2002).
9. D. A. Gewirts, *Biochem. Pharmacol.*, **57**, 727 – 741 (1999).
10. A. Goffeau, B. G. Barrell, B. Bussey, et al., *Science*, **274**, 546 – 567 (1996).
11. L. Guarente, *Methods in Enzymology*, **101**, 181 – 191 (1983).
12. C. Guthrie and G. R. Fink, *Methods in Enzymology*, **194**, 1 – 932 (1991).
13. X. Jia, Y. Zhu, and W. Xiao, *Mutation Research*, **519**, 83 – 92 (2002).
14. P. Klatt and S. Lamas, *Eur. J. Biochem.*, **267**, 4928 – 4944 (2000).
15. G. Minotti, P. Menna, E. Salvatorelli, et al., *Pharmacol. Rev.*, **56**, 185 – 229 (2004).
16. R. Pinkus, L. M. Weiner, and V. Daniel, *Biochemistry*, **34**, 81 – 88 (1995).
17. G. Powis, *Free Rad. Biol. Med.*, **6**, 63 – 101 (1989).
18. Q. F. Schafer and G. R. Buettner, *Free Rad. Biol. Med.*, **30**, 1191 – 1212 (2001).
19. Z. Zhou and S. J. Elledge, *Genetics*, **131**, 851 – 866 (1992).

Поступила 26.01.07

GENOTOXICITY OF DOXORUBICIN ASSESSED ON *Saccharomyces Cerevisiae* Cell Model

Yu. V. Saenko and A. M. Shutov

Ul'yanovsk State University, ul. L. Tolstogo 42, Ul'yanovsk, 432700 Russia

The genotoxicity of doxorubicin was assessed by the induction of ribonucleotide reductase gene expression and by the oxidative stress induction in *Saccharomyces cerevisiae* as a eukaryote cell model. Doxorubicin induced dose-dependent inhibition of cell proliferation, increased the intracellular concentration of GSH and GSSG, and did not significantly influence the malonic dialdehyde concentration. Doxorubicin activated (independently of the concentration) ribonucleotide reductase gene expression, thus increasing GSH concentration. The increase in GSSG concentration is probably indicative of the development of oxidative stress in *Saccharomyces cerevisiae* cells, although this is not accompanied by an increase in the MDA concentration in the cells.