



Сравнительный анализ воздействия цитостатических препаратов на нестабильность генома *Drosophila melanogaster*

О.Н. Антосюк, А.М. Марвин, Н.А. Марвин

Уральский федеральный университет имени первого президента России Б.Н. Ельцина, Екатеринбург

Контактная информация: Антосюк Ольга Николаевна, Antosuk-olga@mail.ru

Морфометрический анализ крыла *Drosophila melanogaster* выявил различные изменения крыловых параметров при воздействии Метотрексатом, Гельданамицином и Митомицином-С, а также сходные изменения при воздействии Этопозидом и Циклофосфаном. При используемой дозе 2 мкг/кг среды повреждения типа «вырезка» на крыле наблюдались только в случае воздействия Метотрексатом. Можно предположить, что именно Метотрексат, Митомицин-С и Гельданамицин вызывают большую геномную нестабильность, судя по косвенным показателям.

Ключевые слова: цитостатики, морфометрический анализ, апоптоз, hobo-элемент.

Введение

Для изучения геномной нестабильности используются различные модельные объекты, в т.ч. и *Drosophila melanogaster* – удобный модельный объект для определения токсического действия различных химических веществ на организм, как на клеточном, так и на организменном уровне.

Особый интерес представляет анализ группы лекарственных препаратов, в т.ч. и цитостатиков. В качестве основных параметров используются средняя индивидуальная плодовитость (СИП), частота встречаемости гибели особей на ранних и поздних этапах эмбрионального развития, в период постэмбрионального развития, а также влияние цитостатиков на уровне соматических клеток крыла. Индуцированная геномная нестабильность вызывается различными стрессовыми факторами, как

физической, так и химической природы. Наибольший интерес представляет собой изучение влияния противораковых лекарственных препаратов, а именно цитостатиков с различными механизмами действия. Большинство исследований посвящено цитостатическим препаратам антиметаболического ряда, таким как Аминоптерин и Метотрексат, в связи с их негативным воздействием на синтез ДНК посредством ингибирования дигидрофолатредуктазы, а также широким применением в практике [5]. В частности, у дрозофилы, помимо негативного влияния на плодовитость и частоту смертности потомства на разных уровнях развития, происходит усиление апоптоза в крыловом имагинальном диске, впоследствии вызывающее наличие повреждения типа «вырезка» на крыловой пластине имаго.

Также интенсивно исследуются воздействия других цитостатических препаратов:

- 1) цитостатики антибиотического ряда (Митомицин-С, Актиномицин Д);
- 2) алкилирующие агенты (Циклофосфан);
- 3) препараты растительного происхождения (Этопозид, Колхицин) [9].

В ряде работ показано, что наблюдается генотоксический эффект цитостатических препаратов, применяемых при различных концентрациях [5].

Также исследуется Гельданамицин – препарат, ингибирующий активность белка теплового шока Hsp90, что, в свою очередь, отражается на уменьшении уровня стрессового ответа клеток [1].

Таким образом, **целью** данного исследования явилось определение геномной нестабильности, вызванной факторами стресса химической природы в линиях дикого типа *Drosophila melanogaster*.

Материалы и методы

В данном исследовании использовались 3 линии дикого типа *Drosophila*

melanogaster: Host (Екатеринбург, 2005), Белгород (Белгород, 2006), Биос-3 (Дзержинск, 2007).

Особи всех 3-х линий содержались в течение всего периода развития на средах, содержащих различные цитостатические препараты в концентрации 2 мкг/кг среды (в исследовании использовалась среда Альдерстона). Данная доза была выбрана для получения достаточного количества материала для морфометрического анализа и анализа жизнеспособности.

В работе использовались цитостатические препараты, различные по механизму воздействия: Метотрексат, Аминоптерин, Митомицин-С, Этопозид, Циклофосфан и Гельданамицин. Для определения степени токсичности препаратов полулетальная доза была определена на Метотрексате (в линиях Биос-3 и Host полулетальная, а в линии Белгород – выше полулетальной, последняя взята для выявления линейных различий), так как только при воздействии данного препарата появлялись повреждения типа «вырезка» на крыле (рис. 1). Остальные препараты исполь-

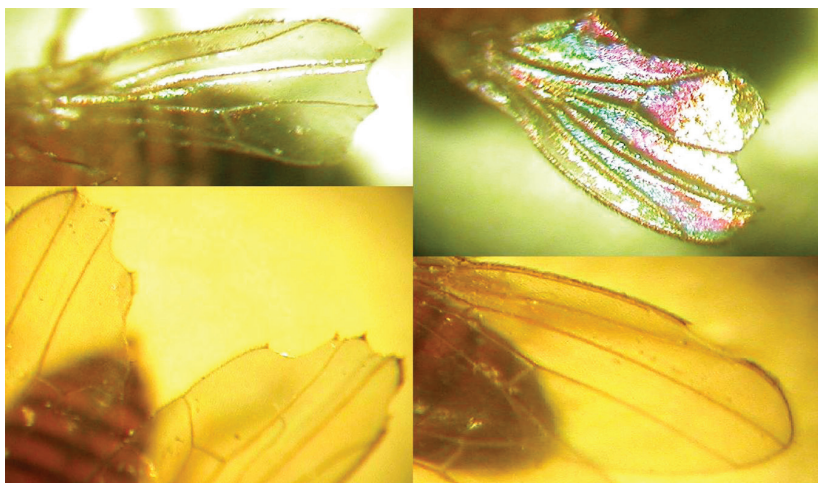


Рис. 1. Варианты повреждений типа «вырезка» на крыле у линий дикого типа *Drosophila melanogaster* после воздействия Метотрексатом в дозе 2 мкг/кг среды.

зовались в аналогичной дозе с Метотрексатом для сравнения.

После вылета имаго, выращенных на среде с цитостатическими препаратами, особи попарно помещались в пробирки, после чего анализировались на жизнеспособность по ряду показателей: средняя индивидуальная плодовитость (СИП), частота встречаемости гибели особей на ранних и поздних этапах эмбрионального развития, а также в период постэмбрионального развития. Все особи анализировались на частоту встречаемости повреждений типа «вырезка» на крыле, а их крылья фиксировались с помощью программы Universal Desktop Ruler.

В работе использовался морфометрический анализ крыла по 18-ти линейным и 6-ти двумерным параметрам крыловой пластины, а полученные результаты анализировались при помощи дискриминантного анализа (Statistica 6.0).

Результаты исследований

Три линии дикого типа (Host, Белгород, Биос-3), выращенные на среде, содержащей цитостатические препараты, продемонстрировали различную степень реакции на химический стресс.

Анализ линий на наличие повреждений типа «вырезка» на крыле показал, что повреждения появляются у особей, выращенных на препаратах, относящихся к группе антиметаболитов, таких как Метотрексат и Аминоптерин. Относительно остальных цитостатических препаратов подобного эффекта выявлено не было.

Концентрация 2 мкг/кг питательной среды были выбрана для получения большего количества жизнеспособных особей, необходимых для анализа плодовитости и морфометрического анализа крыла, а также для выявления линейных различий и различий в токсичности препарата. Несмотря на отсутствие визуального повреждения крыльев, был проведен морфометрический анализ, который позволяет определить изменение линейных и двумерных (S-ячей крыла) параметров после воздействия определенных факторов стресса (рис. 2). Изменение данных параметров происходит за счет перераспределения клеток в крыловом имагинальном диске, увеличения их размера и различной активности компартментов у дрозофилы.

Частота встречаемости повреждений типа «вырезка» на крыле при первичном воздействии Метотрексата состави-

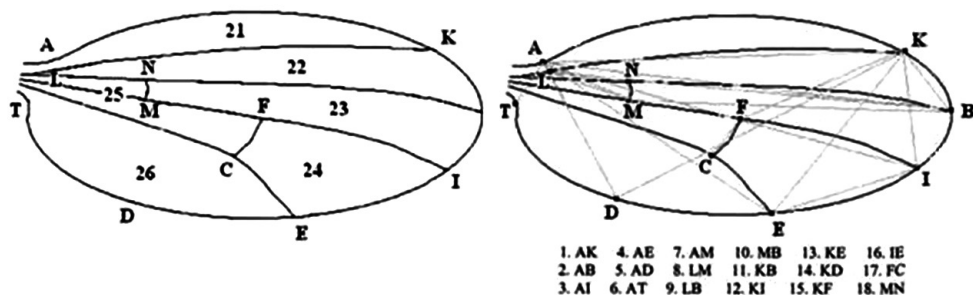


Рис. 2. Схема морфометрического анализа крыловых параметров (справа – линейные, слева – двумерные).

ла в линии Биос-3 11,2%; в линии Белгород – 35,3% и 41,5% в линии Host при концентрации препарата 2 мкг/кг среды. Максимальная частота встречаемости повреждений на крыле в течение селекции на Метотрексате наблюдалась в линии Биос-3 в F2 и составила 73,91%; в линии Белгород в F66 – 72,54%; в линии Host в F16 – 79,44%.

Анализ жизнеспособности (табл. 1) показал, что понижение плодовитости особей всех 3-х линий относительно контрольной группы наблюдается при воздействии Гельданамицином, а также Метотрексатом, за исключением в последнем случае линии Host. К тому же, линия Биос-3 при воздействии Циклофосфаном отвечает не повышением смертности особей на эмбриональном

уровне, а понижением (на всех этапах развития), подобную картину можно отметить и в линии Белгород, но при воздействии Этопозид (повышение частоты встречаемости ранней эмбриональной смертности и понижение частоты встречаемости поздней эмбриональной смертности). Таким образом, чувствительность этих двух линий к вышеуказанным 2-м препаратам только подчеркивает линейные различия и говорит об избирательной чувствительности к различным факторам химического стресса. Также можно отметить, что при воздействии Митомицина-С частота встречаемости эмбриональной смертности особей в линиях Биос-3 и Белгород также уменьшается, чего не наблюдается в линии Host.

Таблица 1

Показатели жизнеспособности линий дикого типа *Drosophila melanogaster* при воздействии цитостатических препаратов Метотрексат, Митомицин-С, Циклофосфан, Этопозид, Гельданамицин в дозе 2 мкг/кг среды

Показатель Линия - воздействие	СИП (средняя индивидуальная плодовитость)	Частота встречаемости ранней эмбриональной смертности	Частота встречаемости поздней эмбриональной смертности
Биос-3-Контроль	26,99±2,34	3,78±0,89	1,20±0,61
Биос-3-Метотрексат	12,44±1,42	2,52±0,77	1,01±0,26
Биос-3-Митомицин-С	25,59±2,05	1,30±1,04	0,15±0,06
Биос-3-Циклофосфан	10,06±1,85	1,59±0,37	0,54±0,10
Биос-3-Этопозид	21,91±1,71	3,54±0,91	1,19±0,41
Биос-3-Гельданамицин	6,54±1,83	2,92±1,09	0,61±0,23
Белгород-Контроль	34,49±2,77	1,11±0,46	0,73±0,23
Белгород-Метотрексат	21,68±1,62	2,50±0,74	1,84±0,52
Белгород-Митомицин-С	30,58±2,42	0,23±0,22	0,13±0,09
Белгород-Циклофосфан	19,99±1,89	0,75±0,20	0,40±0,11
Белгород-Этопозид	28,36±1,61	4,48±0,85	0,45±0,12
Белгород-Гельданамицин	3,24±0,98	13,94±3,24	0,57±0,22
Host-Контроль	18,74±2,67	3,11±0,92	0,66±0,21
Host-Метотрексат	17,79±2,26	3,70±1,14	0,96±0,36
Host-Митомицин-С	24,40±1,60	0,11±0,09	0,06±0,05
Host-Циклофосфан	15,30±2,20	1,43±0,52	0,06±0,02
Host-Этопозид	23,54±1,73	6,4±1,31	0,59±0,13
Host-Гельданамицин	0,57±0,24	15,20±3,80	0,54±0,38

Воздействие цитостатических препаратов рассматривалось и относительно проявления биологического эффекта на уровне соматических клеток. Как уже указывалось выше, повреждения типа «вырезка» на крыле наблюдаются только при воздействии Метотрексата в дозе 2 $\mu\text{г/кг}$ питательной среды. Повреждения данного типа возникают как на костальной, так и на внутренней и внешней латеральной части крыловой пластинки (рис. 1). Также биологический эффект цитостатических препаратов, даже в отсутствии повреждений (в зависимости от уровня апоптоза в крыловом имажинальном диске), можно определить, используя морфометрический анализ линейных и двумерных параметров. Таким образом, было установлено, что у всех 3-х линий при воздействии цитостатических препаратов, по-разному воздействующих на генетический материал и обладающих разным биологическим эффектом, двумерные параметры крыловой пластинки (площади ячеек крыла) изменяются во всех экспериментах относительно контрольной группы, несмотря на то, что повреждения типа «вырезка» на крыле встречаются только в случае воздействия Метотрексатом. В свою очередь, анализ по линейным параметрам крыловой пластинки показал, что в линиях Биос-3 и Белгород изменяется большое количество параметров, характеризующих как ширину, так и длину крыла: в линии Биос-3 – АК, АВ, АЕ, АД, LB, KB, KE, KF, IE, FC, MN; в линии Белгород – АК, AI, AE, AD, AT, AM, KE, KF, IE, FC, MN. В линии Host изменению подвергаются такие линейные параметры как АЕ, АТ, KE, KF, FC, NM, и, соответственно, характеризующие ширину крыловой пластинки (рис. 3).

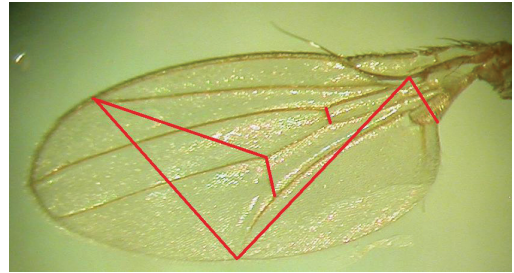


Рис. 3. Схема изменяющихся линейных параметров крыла линии Host при воздействии цитостатических препаратов в дозе 2 $\mu\text{г/кг}$ среды.

Также был проведен ряд исследований, посвященных пролонгирующему действию Гельданамицина, как на уровне генеративных, так и на уровне соматических клеток. В связи с тем, что Гельданамицин (GA) растворялся в Диметилсульфоксиде (ДМСО), для сравнения приводятся значения, полученные при воздействии Гельданамицина, только для GA+ДМСО и контрольной группы (табл. 2).

Как видно из табл. 2, линии Биос-3 и Белгород характеризуются меньшей чувствительностью к Гельданамицину, чем линия Host, но все линии после воздействия Гельданамицина имеют очень низкую плодовитость и высокую смертность на эмбриональном уровне. В линии Host после добавления в питательную среду ДМСО наблюдалась высокая гибель особей, выживаемость оказалась недостаточной для проведения анализа плодовитости и частоты встречаемости эмбриональной смертности. Также высокая частота гибели имаго наблюдалась в F1 после воздействия Гельданамицина.

Биологический эффект, оказываемый Гельданамицином на уровне соматических клеток, определялся при помощи

Показатели жизнеспособности линий дикого типа *Drosophila melanogaster* при воздействии Гельданамицина (GA) в дозе 2 мкг/кг среды, а также потомства до F2

Показатель / Линия - воздействие	СИП (средняя индивидуальная плодовитость)	Частота встречаемости ранней эмбриональной смертности	Частота встречаемости поздней эмбриональной смертности
Биос-3 Контроль	26,99±2,34	3,78±0,89	1,20±0,61
Биос-3 ДМСО	17,6±1,91	12,51±2,46	1,05±0,27
Биос-3 GA+ДМСО	6,54±1,83	2,92±1,09	0,61±0,23
Биос-3 GA+ДМСО F1	16,97±1,74	1,32±0,87	0,75±0,27
Биос-3 GA+ДМСО F2	25,28±1,68	1,52±0,52	1,09±0,34
Белгород Контроль	34,49±2,77	1,11±0,46	0,73±0,23
Белгород ДМСО	12,10±1,59	8,04±1,56	0,79±0,21
Белгород GA+ДМСО	3,24±0,98	13,94±3,28	0,57±0,22
Белгород GA+ДМСО F1	25,19±1,56	3,27±2,04	1,23±0,64
Белгород GA+ДМСО F2	17,78±1,50	2,02±0,54	0,76±0,26
Host Контроль	18,74±2,67	3,11±0,92	0,66±0,21
Host GA+ДМСО	0,57±0,24	15,20±3,80	0,54±0,38
Host GA+ДМСО F2	30,03±2,39	0,30±0,10	0,19±0,08

морфометрического анализа крыла до F3. В каждой линии проводилось 2 анализа (на уровень тератогенного и пролонгирующего эффекта). В первом случае сравнивались крыловые параметры особей, выращенных на Гельдамицине+ДМСО, на ДМСО, и особей контрольной группы. Во втором случае проводился анализ изменения крыловых параметров особей, выращенных на Гельданамицине, особей из F1, F2 и из F3.

В линии Биос-3 в ряду поколений после воздействия Гельданамицина изменяются крыловые параметры, затрагивающие все крыло; что же касается тератогенного эффекта, то при токсическом воздействии меняются линейные параметры, затрагивающие изменение ширины крыла. В линии Белгород в обоих случаях изменения затрагивают линейные параметры, характеризующие как ширину, так и длину крыла. Изме-

ние же двумерных параметров не наблюдается лишь относительно 21 ячейки в обоих случаях, а также относительно очень большой по площади ячейки 26 в случае анализа на уровень тератогенного эффекта. В линии Host проводился лишь анализ на уровень пролонгирующего эффекта. Он показал изменение параметров, характеризующих ширину крыловой пластинки, а также стабильность ячеек 21 и 22, характеризующих внутренний край крыла.

Обсуждение результатов

Биологический эффект цитостатических препаратов, широко применяемых в практике, исследуется уже длительное время [2, 3, 4]. Из исследованной группы противораковых препаратов наибольшим тератогенным эффектом обладали два цитостатика – Метотрексат и Гельданамицин. Воздействие Метотрекса-

та во всех 3-х линиях на соматические клетки имагинального мезоторакального диска вызывает изменение крыловых параметров относительно контрольной группы. При воздействии же на генеративные клетки тератогенный эффект наблюдается в линиях Биос-3 и Белгород. Частота встречаемости повреждений типа «вырезка» на крыле колеблется в ходе направленной селекции. В линии Биос-3 частота встречаемости повреждений максимальна лишь в самом начале эксперимента, после чего она стабилизируется и держалась практически на одном уровне. Что касается линии Host, частота встречаемости повреждений, наблюдаемая в ходе отбора, всегда была выше, чем в линиях Биос-3 и Белгород. В линии Белгород частота повреждений типа «вырезка» на крыле максимального значения достигла незадолго до гибели всех особей данной линии в ходе направленной селекции. Морфометрический анализ крыла у особей, выращенных на Метотрексате, демонстрирует изменение площадей ячеек крыла у всех 3-х линий и изменение большого количества линейных параметров, затрагивающих как длину, так и ширину крыла.

Таким образом, можно предположить, что Метотрексат, как представитель группы антиметаболитов, интенсивнее влияет на процессы формирования крыла, чем остальные, используемые в данной работе цитостатические препараты, а, соответственно, обладает наибольшим тератогенным эффектом на соматические клетки. Избирательная чувствительность линий к определенным препаратам (Циклофосфану, Этопозиду или Митомицину-С) определяется, предположительно, линейными различиями, базируемыми, по-видимому, на различном количестве

транспозонов, - в частности, Р- и hobo-элементов. Как было показано в работах Георгиева П.Г. (1990 г.), Митомицин-С, введенный в брюшко самцов инъекционным путем, вызывает у потомства перестройки и более высокий уровень мутаций [3]. В свою очередь, Циклофосфан тоже характеризовался ранее как препарат, увеличивающий уровень смертности у дрозофилы [7]. Этопозид же, посредством ингибирования топоизомеразы II, стимулирует всплеск геномной нестабильности, благодаря тому, что активность транспозонов остается без контроля [6, 10]. Таким образом, полученные нами данные о различной реакции линий на вышеуказанные препараты подтверждают предположение о линейных различиях и, соответственно, различной активности и копийности транспозонов, и об изменении этой активности и копийности после воздействия Этопозид, Циклофосфана и Митомицина-С. Возможно, различная чувствительность линий дикого типа к данным цитостатикам обусловлена значительным уменьшением или увеличением копийности hobo- и hobo-подобных элементов уже после первичного воздействия препаратов.

Исходя из данных морфометрического анализа, можно предположить, что препараты Этопозид и Циклофосфан изменяют линейные и двумерные параметры крыловой пластинки в одном направлении (рис. 4-5). Данный эффект наблюдается во всех 3-х линиях. По различным изменениям параметров крыла при воздействии Митомицина-С, Метотрексата и Гельданамицина можно заключить о биологических эффектах данных препаратов, формируемых, по-видимому, за счет различной активности компартментов, а также за счет различной чувстви-

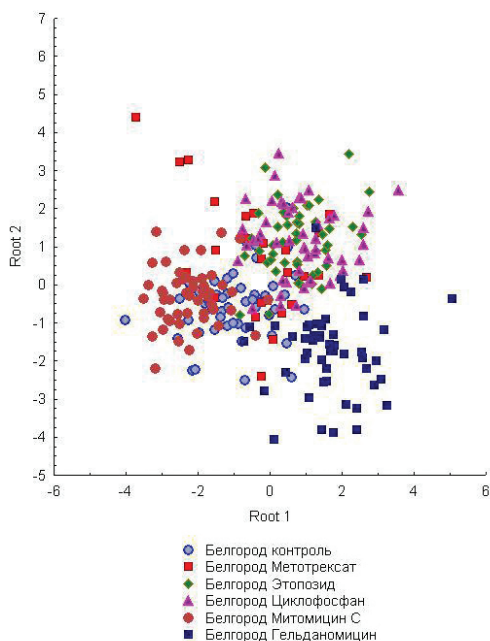


Рис. 4. Графическое отображение дискриминантного анализа линейных крыловых параметров при воздействии цитостатических препаратов в линии Белгород.

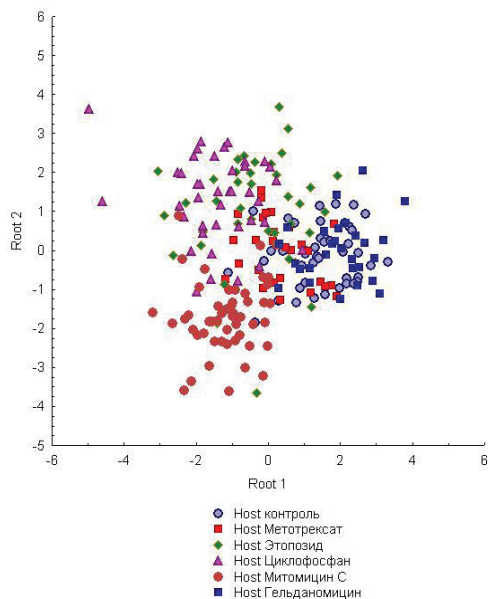


Рис. 5. Графическое отображение дискриминантного анализа линейных крыловых параметров при воздействии цитостатических препаратов в линии Host.

тельности к повреждающим агентам.

Особый интерес представляет линия Host, которая наименее чувствительна ко всем исследуемым в данной работе препаратам, как в отношении плодовитости, так и в отношении изменения крыловых параметров. Исключение составляет воздействие на данную линию Гельданамицина, которое вызывает сильный тератогенный эффект. В работах V. Specchia, L. Piacentini, et al. (2010 г.) проводились исследования на дрозофиле с использованием Гельданамицина, который, как известно, подавляет активность белка Hsp90, и было получено множество аномалий после воздействия данного цитостатика [8]. Авторами было высказано предположение о возможном всплеске активности транспозонов благодаря ингибированию Hsp90. Полученные

нами данные на всех линиях и, особенно, на линии Host подтверждают выдвинутое авторами предположение.

Морфометрический анализ крыла на всех 3-х линиях установил, что после воздействия Гельданамицина крыловые параметры особей изменяются настолько, что после культивирования в течение 3-х поколений на чистой среде они продолжают отличаться от таковых в контрольной группе. По-видимому, вызванный использованием Гельданамицина всплеск транспозонной активности сохраняется в некоторой степени и при последующей селекции на чистой среде, в отсутствии фактора химического стресса у последующих поколений, о чем также свидетельствует почти 100% гибель особей в линии Host в F1 после воздействия данного препарата.

Выводы

Различная чувствительность к группам цитостатических препаратов, использованных в работе, свидетельствует о наличии линейных различий среди особей дикого типа.

Морфометрический анализ крыла показал, что цитостатики с различным механизмом действия обнаруживают сходный биологический эффект.

Линейные различия в отношении чувствительности к повреждающим агентам, а также активизация транспозонов могут быть прослежены в ходе морфометрического анализа.

Наибольшая активность транспозонов прослеживается на фоне воздействия Метотрексата и Гельданамидина.

Список литературы

1. *Debat V., Milton C.C., Rutherford S., Klinenberg C.P., et al.* Hsp90 and the quantitative variation of wing shape in *Drosophila melanogaster* // *Evolution*. 2006. V. 60. P. 2529-2538.
2. *Depira M., Valente V.L., Margis R., Loreto E.L.* The hobo transposon and hobo-related elements are expressed as developmental genes in *Drosophila* // *Gene*. 2009. V. 448. P. 57-63.
3. *Georgiev P.G., Korochkina S.E., Georgieva S.G., Gerasimova T.I.* Mitomycin C induces genomic rearrangements involving transposable elements in *Drosophila melanogaster* // *Mol. Gen. Genet.* 1990. V. 220. P. 229-233.
4. *Kim Y.J., Hice R.H., O'Brochta D.A., Atkinson P.W.* DNA sequence requirements for hobo transposable element transposition in *Drosophila melanogaster* // *Genetica*. 2011. V. 139. P. 985-997.
5. *Kislukhin G., King E., Walters K., Macdonald S.* The Genetic architecture of Methotrexate toxicity is similar in *Drosophila melanogaster* and Humans // *Genes/Genomes/Genetics*. 2013. V. 3. P. 1301-1310.
6. *Nahon E., Best-Belpomme M., Saucier J.M.* Analysis of the DNA topoisomerase-II-mediated cleavage of the long terminal repeat of *Drosophila* 1731 retrotransposon // *Eur. J. Biochem.* 1993. V. 218. P. 95-102.
7. *Sadiq M.F., Al-Qurashe F.A.* The effect of trifluoperazine on the induction of sex-linked recessive lethals by cyclophosphamide in *Drosophila melanogaster* // *Drug Chem. Toxicol.* 2004. V. 27. P. 169-178.
8. *Specchia V., Piacentini L., Tritto P., Fanti L.* Hsp90 prevents phenotypic variation by suppressing the mutagenic activity of transposons // *Nature*. 2010. V. 463. P. 662-665.
9. *Tapadia M.G., Lakhota S.C.* Expression of *mdr49* and *mdr65* multidrug resistance genes in larval tissues of *Drosophila melanogaster* under normal and stress conditions // *Cell Stress Chaperones*. 2005. V. 10. P. 7-11.
10. *Torres C., Creus A., Marcos R.* Genotoxic activity of four inhibitors of DNA topoisomerases in larval cell of *Drosophila melanogaster* as measured in the wing spot assay // *Mutat. Res.* 1998. V. 413. P. 191-203.

The comparative analysis of influence of cytostatic drugs on genome instability of *Drosophila melanogaster*

O.N. Antosyuk, A.M. Marvin, N.A. Marvin

Morphometric analysis of *Drosophila melanogaster* wings revealed various change of wing's parameters at influence by Methotrexate, Helderanamicine and Mytomicine-C, and similar changes at influence by Etoposide and Cyclophosphane. At a used dose of 2 mkg/kg of the environment of damage like "cutting" on a wing were observed only in case of influence by the Methotrexate. It is possible to assume what exactly the Methotrexate, Mitomicine-S and Geldanamicine cause big genomic instability, judging by indirect indicators.

Key words: cytostatics, morphometric analysis, apoptosis, hobo-element.