

УДК 577.21:582.282.23

**ИНДУЦИРОВАННЫЙ ДОКСОРУБИЦИНОМ РОСТ ВНУТРИКЛЕТОЧНОЙ
КОНЦЕНТРАЦИИ ВОССТАНОВЛЕННОГО ГЛУТАТИОНА В КЛЕТКАХ *S. CEREVISIAE*
СВЯЗАН С АКТИВАЦИЕЙ ДНК-РЕПАРИРУЮЩИХ МЕХАНИЗМОВ**

Е. А. Крючков², Е.В. Расторгуева¹, Ю.В. Саенко¹

Кафедра фармакологии с курсом клинической фармакологии¹, группа молекулярно-биологических исследований ЦНИЛ² Ульяновского государственного университета, 432700, Ульяновск ул. Л. Толстого, д. 42. E-mail: kfarm@ulsu.ru

Резюме: Целью настоящей работы явилось изучение влияния доксорубина на концентрацию глутатиона, активность ДНК-репарирующих метаболических путей и Yap1 – зависимых редокс-чувствительных путей с использованием эукариотической клеточной модели *Saccharomyces cerevisiae*. В результате продемонстрировано, что доксорубин вызывает увеличение концентрации GSH в клетках *S. cerevisiae*, увеличение внутриклеточной концентрации GSSG и общего содержания глутатиона в клетке (GSH+GSSG), но вместе с этим вызывает снижение отношения GSH/GSSG. Эти эффекты доксорубина на глутатионовый метаболизм, по крайней мере частично, опосредуются через ДНК-репарирующие механизмы

Ключевые слова: глутатион, доксорубин, оксидативный стресс, рибонуклеотидредуктаза.

DOX-INDUCED INTRACELLULAR CONCENTRATION OF RENOVATED GLAUTIN IN S-CELLS; CEREVISIAE IS CONNECTED WITH DNA REPAIRING ACTIVATION MECHANISMS

Ye.A. Kryuchkov, YE.V. Rastorgueva, Yu. V. Saenko

¹Department of Pharmacology and ² group of molecular biology research of central scientific-research laboratory

Ulyanovsk State University, Ulyanovsk, Russia. E-mail: kfarm@ulsu.ru

Abstract: The aim of this study was to investigate the effect of doxorubicin upon the glutathione concentration, DNA-repairing and metabolic tracts and Yap1 depended upon redox-sensitive tracts activation by using eukaryotic cell model *Saccharomyces cerevisiae*. The results show that doxorubicin increases the production of GSH and GSSG, but at the same time provokes the reduction GSH/GSSG ratio in *Saccharomyces cerevisiae* cells. DOX really effects on GSH metabolism, at least partially, due to activation of DNA-repair mechanisms.

Key words: doxorubicin, glutathione, oxidative stress, ribonucleotide reductase.

Доксорубин (ДОК) является широко применяемым антрациклиновым антибиотиком. К сожалению, препарат обладает кардио- и нефротоксичностью, при этом механизмы токсичности остаются невыясненными. Обсуждается возможность индукции препаратом оксидативного стресса, а также влияние ДОК на внутриклеточный гомеостаз железа [1].

Удобной моделью для изучения внутриклеточных сигнальных механизмов являются одноклеточные эукариотические организмы – *Saccharomyces cerevisiae*. Это связано с тем, что многие внутриклеточные метаболические, генетические и сигнальные механизмы в общих чертах схожи у большинства эукариотических клеток различных видов. Кроме этого, дрожжи уже успешно использовались для изучения токсических эффектов лекарственных средств, в том числе и антрациклиновых антибиотиков [2].

Одним из основных механизмов действия ДОК является ДНК-повреждающее действие. В результате повреждения ДНК запускается каскад событий, обусловленный активацией ДНК-репарирующих метаболических путей, при этом механизмы защиты от ДНК-повреждающего действия ДОК изучены недостаточно [3]. При воздействии ДОК активируются гены рибонуклеотидредуктазы (*RNR*) кодирующие одноименный фермент, состоящий из трёх субъединиц, активность которого коррелирует с концентрацией GSH, что косвенно свидетельствует в пользу того, что причиной роста концентрации GSH, в ряде случаев, может быть увеличение экспрессии генов рибонуклеотидредуктазы [4].

Для увеличения синтеза GSH необходимы дополнительные количества цистеина, начальным и ключевым этапом синтеза которого является восстановление сульфата до сульфита, катализируемое 3-фасфоаденилсульфатредуктазой. В качестве донора водорода, в этой реакции используется тиоредоксин. Ферменты глутаредоксин и тиоредоксин являются, также, донорами водорода в реакции восстановления рибозы до дезоксирибозы, которая катализируется рибонуклеотидредуктазой. Таким образом, в клетках существует связь между концентрацией GSH, активностью фермента рибонуклеотидредуктазы и активностью тиоредоксина [5].

Гены тиоредоксина и глутаредоксина у *Saccharomyces cerevisiae* находятся под контролем редокс-чувствительного фактора транскрипции Yap1 и обычно активируются в ответ на возникновение внутриклеточного оксидативного стресса [6]. Yap1 также регулирует экспрессию генов глутатионредуктазы,

глутатион пероксидазы и гамма-глутамилцистеин синтетазы, который является ключевым ферментом синтеза глутатиона [6].

Исходя из вышеизложенного можно предположить, что доксорубин может вызывать увеличение внутриклеточного содержания глутатиона. В пользу этого свидетельствует; во-первых способность доксорубина активировать ДНК-репарирующие метаболические пути, а во-вторых, активировать Yар1 – зависимые редокс-чувствительные механизмы.

В настоящей работе изучено влияние доксорубина на концентрацию глутатиона, активность ДНК-репарирующих метаболических путей и Yар1 – зависимых редокс-чувствительных путей с использованием эукариотической клеточной модели *Saccharomyces.cerevisiae*.

Материалы и методы

В исследовании использовался штамм YPH499 (*MAT α* *ura3-52*, *lys2-801*, *ade2-101*, *trp1- Δ 63*, *his3- Δ 200*, *leu2- Δ 1*). Плазмида pZZ2 (*YCp*, *URA3*, *RNR3-LacZ*), содержащая промотор гена рибонуклеотидредуктазы-3, сцепленный с геном б-галактозидазы получена от д-ра С. Эледжа (Центр геномики и протеомики, Гарвардская школа медицины, Бостон, США) [7]. Плазмида pCLZ-314 (*TRP1*, *YRE-CYC1-LacZ*) содержащая Yар1-респонсивный элемент (YRE) гена тиоредоксина сцепленный с геном Δ -галактозидазы получена от д-ра В. Скотта Моу-Ройли (кафедра физиологии и биофизики, университет Айовы, Айова, США) [8].

Инкубацию клеток с различными концентрациями ДОК проводили в течении 24 часов при температуре 25° С в минимальной синтетической среде без урацила. Проводилось минимум 5 опытов с одной и той же концентрацией ДОК. Инкубация осуществлялась на качалке (250 об/мин) в круглодонных колбах объемом 250 мл, объем среды – 30 мл. Начальная концентрация клеток во всех опытах была одинаковой и составляла OD₆₀₀ = 0,3. Для определения степени клеточной пролиферации определялась оптическая плотность клеток при 600 нм (OD₆₀₀) [9].

Трансформацию клеток осуществляли с использованием ацетата лития по методу Р. Гейтца [10].

Определение активности Δ -галактозидазы проводилось с использованием *o*-нитрофенилгалактопиранозида в качестве субстрата и выражалась в единицах Миллера [11].

Концентрацию малонового диальдегида (МДА) определяли в тесте с тиобарбитуровой кислотой по методу Андреевой Л.Б. и выражали в мкМ/мг сухой клеточной массы [12].

Для определения концентрации восстановленного глутатиона (GSH) и окисленного глутатиона (GSSG) клетки отмывались от среды и суспендировались в равном объеме 0,1 М фосфатного буфера (рН=7,0). Клеточная суспензия лизировалась при нагревании 95 – 100 С° в течение 90 сек., и центрифугировалась 3000 g. 5 мин., 0,5 объема полученного лизата бралось для определения GSH, вторая часть оставлялась для определения суммарного значения GSH + GSSG. GSH определялся в реакции с 5,5'-дитио-бис-нитробензойной кислотой. Оптическую плотность измеряли через 15 минут при длине волны 412 нм. Суммарная концентрация GSH + GSSG определялась после инкубации оставшегося 0,5 объема лизата в присутствии 1 U/мл глутатион редуктазы и 300 мкМ НАДФН₂ в реакции с ДНТБ. Перед добавлением ДНТБ из раствора удалялась глутатион редуктаза путем осаждения трихлоруксусной кислотой. Концентрация GSSG находилась как разница между суммарной концентрацией GSH + GSSG и концентрацией GSH. Количество GSH и GSSG выражали в мг на 10⁷ клеток (OD₆₀₀ = 1,0).

Результаты обработаны статистически с использованием критерия *t* Стьюдента для парных переменных. Множественную регрессию рассчитывали с использованием метода наименьших квадратов. Показатели представлены как M \pm SD. Различия между группами считали достоверными при *p* < 0,05.

Результаты

В табл. 1, представлены показатели клеточной пролиферации и выживаемости при различных концентрациях доксорубина в среде. Как видно из таблицы доксорубин вызывал зависимое от концентрации снижение темпов клеточной пролиферации, что свидетельствует о цитостатическом эффекте доксорубина в отношении дрожжевых клеток. Количество погибших клеток зависело от концентрации доксорубина. Наибольший процент погибших клеток был отмечен при концентрации ДОК 50 мкМ – 7,02%.

Из табл. 1 видно, что доксорубин вызывал рост концентрации GSH на 26-44%. Одновременно с ростом концентрации GSH, отмечался достоверный рост концентрации GSSG на 88-188%. Отношение GSH/GSSG с ростом концентрации ДОК снижалось. Так в контрольных экспериментах этот показатель составлял 5,61 \pm 0,59, тогда как в экспериментах с 10, 20, 30, 40, 50 мкМ ДОК отношение GSH/GSSG составляло 5,51 \pm 0,46 (*p*<0,01); 3,76 \pm 2,39 (*p*>0,05); 3,55 \pm 0,63 (*p*<0,01) и 3,08 \pm 0,70 (*p*<0,01), 2,65 \pm 1,08 (*p*>0,05); соответственно. Таким образом, при увеличении концентрации ДОК, несмотря на рост концен-

Влияние доксорубина на клеточную пролиферацию, концентрацию глутатиона восстановленного и глутатиона окисленного

	Контроль	10 мкМ	20 мкМ	30 мкМ	40 мкМ	50 мкМ
OD₆₀₀ с.о.п.	0,902± 0,02 5	0,874± 0,0112 p<0,001	0,845± 0,020 p<0,001	0,796±0,0135 p<0,001	0,804± 0,005 p<0,001	0,777±0,0217 p<0,001
Погибшие клетки в % от общего числа	2,023 ±0,022	2,21± 0,21	6,22 ± 0,73 p<0,001	6,73 ±1,51 p<0,001	5,18 ± 0,52 p<0,001	7,02 ± 0,75 p<0,001
GSH мкМ/10⁷ клеток	16,09±0,21	20,31±1,58 p<0,001	21,94± 1,19 p<0,001	23,32±0,64 p<0,001	22,26±1,05 p<0,001	21,97±0,96 p<0,001
GSSG мкМ/10⁷ клеток	2,87±0,11	5,40±0,31 p<0,001	6,17±0,50 p<0,001	7,57±0,22 p<0,001	7,36±0,35 p<0,001	8,28±0,104 p<0,001

трации GSH, отношение GSH/GSSG уменьшалось, что свидетельствует о снижении окислительно-восстановительного потенциала. Однако говорить о развитии оксидативного стресса в наших экспериментах нельзя, так как нами не было выявлено статистически достоверных различий в содержании малонового диальдегида в интактных клетках и клетках, растущих в присутствии ДОК. В контрольной группе концентрация малонового диальдегида составляла 0,009±0,003 мкМ/мг сухой клеточной массы, при инкубации клеток с 10, 20, 30, 40 и 50 мкМ ДОК аналогичный показатель составлял 0,013±0,003 (p>0,05); 0,013±0,003 (p>0,05); 0,008±0,002 (p>0,05); 0,011±0,002 (p>0,05); и 0,009±0,003 (p>0,05); мкМ/мг сухой клеточной массы, соответственно.

Влияние ДОК на экспрессию генов рибонуклеотидредуктазы 3 и тиоредоксина мы оценивали с помощью репортерных генетических конструкций *RNR3-LacZ* и *TRX2-LacZ*. В репортерных генетических конструкциях *RNR3-LacZ* и *TRX2-LacZ* промотор гена рибонуклеотидредуктазы-3 (*RNR3*) и *Yap1*-респонсивный элемент гена тиоредоксина (*TRX2*) сцеплены с ферментом β-галактозидазой, что даёт возможность по величине активности β-галактозидазы судить о

степени экспрессии генов рибонуклеотидредуктазы-3 и тиоредоксина и в свою очередь даёт представление об активности ДНК-репарирующих метаболических путей и *Yap1*-зависимых редокс-чувствительных путей [7, 8].

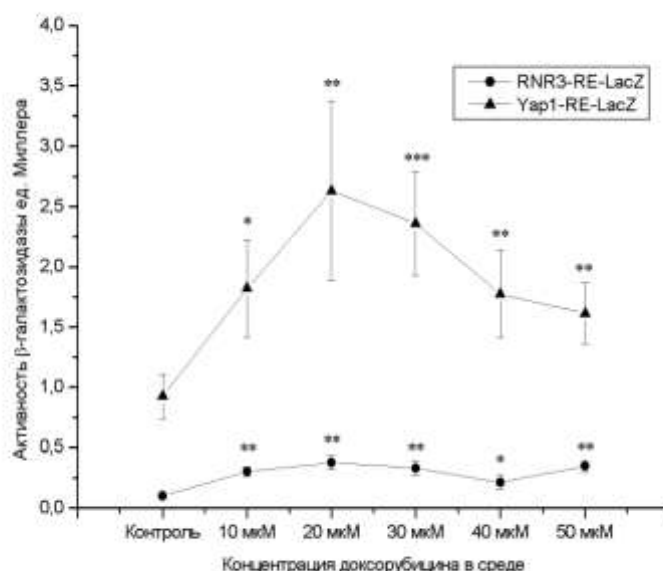


Рис. 1. Величина экспрессии репортерных генетических конструкций *RNR3-LacZ* и *TRX2-LacZ*, выраженных через активность β-галактозидазы, в клетках *S. cerevisiae* инкубированных в среде с разной концентрацией доксорубина. Примечание: * - p < 0,05; ** - p < 0,01

В ответ на увеличение концентрации ДОК в ростовой среде наблюдалось достоверное увеличение

экспрессии RNR3-LacZ и TRX2-LacZ при всех изученных концентрациях ДОК, о чем свидетельствует увеличение активности β -галактозидазы (рис.1). Экспрессия RNR3-LacZ и TRX2-LacZ не зависела от концентрации ДОК. Так, наибольшая активность β -галактозидазы и наибольшая экспрессия RNR3-LacZ и TRX2-LacZ наблюдалась при концентрации ДОК в ростовой среде равной 20 мкМ, а минимальная активность наблюдалась при концентрации ДОК 40 мкМ (рис. 1).

На рис. 2 отображена зависимость между концентрацией глутатиона и экспрессией RNR3-LacZ. Из рисунка видно, что существует положительная зависимость между внутриклеточной концентрацией GSH и экспрессией репортерной генетической конструкции RNR3-LacZ. При этом между экспрессией TRX2-LacZ и концентрацией GSH достоверной связи не обнаружено.

Обсуждение

Представленные данные свидетельствуют, что ДОК вызывал увеличение внутриклеточного содержания GSH у *S. cerevisiae*. Сам по себе факт роста концентрации GSH в ответ на добавление в ростовую среду доксорубина является новым и раньше не описывался в литературе. Однако, наши данные не согласуются с многочисленными фактами, свидетельствующими о снижении концентрации GSH в ответ на введение доксорубина, в частности, в предыдущих работах мы отмечали, что в ответ на введение доксорубина крысам происходит снижение концентрации GSH в почках [25].

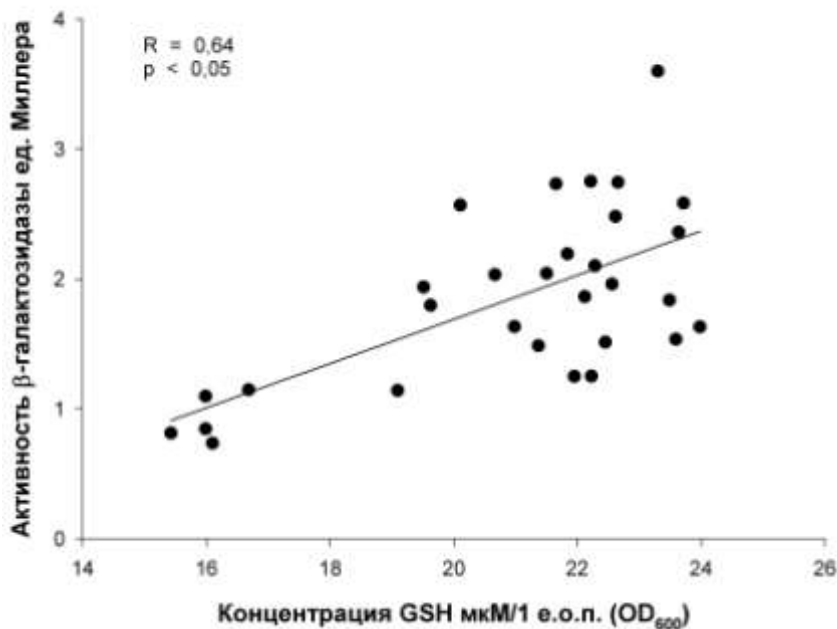


Рис. 2. Связь между концентрацией восстановленного глутатиона и экспрессией репортерной генетической конструкции RNR3-LacZ, выражаемой через активность β -галактозидазы.

Расхождение данных полученных на эукариотической модели *S. cerevisiae* с экспериментальными данными полученными на животных, по нашему мнению, можно объяснить различной доступностью глюкозы. Окисление глюкозы в пентозо-фосфатных путях является основным источником НАДФН₂ для клетки, и следовательно, восстановленных эквивалентов в виде GSH. *S. cerevisiae* культивировались в среде с высоким содержанием глюкозы. Клетки экспериментальных животных могли испытывать дефицит в глюкозе.

Доксорубин способен принимать электрон и восстанавливаться до семихинона [1]. Доксорубин в форме семихинона является свободным радикалом и способен восстанавливать кислород до супероксид анион-радикала. В ходе реакции с кислородом, кроме супероксид анион-радикала, генерируется исходная форма доксорубина (т.е. хинон). Характерные для ДОК редокс-циклические реакции приводят к генерации свободно-радикальных молекул, что в итоге вызывает внутриклеточный окислительный стресс. Окислительный стресс приводит к повреждению ДНК и к активации ДНК-репарирующих механизмов [1,7], а также к запуску редокс-чувствительных сигнальных механизмов [3]. Активация этих механизмов могла вызвать наблюдаемое нами увеличение концентрации GSH.

Активация репортерной конструкции RNR3-LacZ происходила на фоне повышения концентрации GSH. В процессе репарации ДНК, также необходимы дополнительные количества рибозы, которая синтезируется в ходе реакций пентозо-фосфатных путей. Кроме образования рибозы, в ходе реакций пентозо-фосфатных путей, происходит восстановление НАДФ⁺ до НАДФН₂, что также может вызвать увели-

чении концентрации GSH. Нами была выявлена положительная корреляция между активацией репортерной генетической конструкции *RNR3-LacZ* и концентрацией GSH, что, согласуется с данными других исследователей [5]. Таким образом, активация ДНК-репарирующих метаболических путей сопровождается восстановлением дополнительного количества GSH.

Репортерная генетическая конструкция *TRX2-LacZ*, которая содержала *Yap1*-респонсивный элемент гена тиоредоксина сцепленный с геном β -галактозидазой, также активировалась в ответ на добавление ДНК к клеткам *S. cerevisiae*. *Yap1* относится к семейству высококонсервативных белков эукариотических организмов - AP-1 которые, в основном, отвечают за клеточный ответ на оксидативный стресс [14]. Штаммы дрожжей с разрушенным геном *Yap1* становятся очень чувствительными к оксидативному стрессу. Из литературы известно, что хотя *Yap1* положительно влияет на экспрессию ряда генов в ответ на оксидативный стресс, но в числе этих генов нет таких, которые могли бы повлиять на внутриклеточный окислительно-восстановительный потенциал, а присутствуют лишь такие, которые сами используют GSH для детоксикации активных молекул [15]. Мы не обнаружили корреляции между активацией репортерной генетической конструкции *TRX2-LacZ* и концентрацией GSH, что согласуется с ранее полученными результатами в других лабораториях [5, 6].

Несмотря на рост содержания GSH в ответ на увеличение концентрации доксорубина, отношение GSH/GSSG уменьшалось, что свидетельствует о снижении окислительно-восстановительного потенциала. Такой эффект, вероятно, является следствием редокс-циклической активности ДНК. Однако, снижение соотношения GSH/GSSG не приводит к запуску процессов перекисного окисления биомолекул, о чем свидетельствует содержание малонового диальдегида.

Нами не было найдено различий в концентрации МДА между контрольной и опытной группой. По нашему мнению, отсутствие проявлений ДНК-индуцированного оксидативного стресса на модели *S. cerevisiae* связано с одной стороны с увеличением потока глюкозы через пентозо-фосфатные пути, вследствие активации ДНК-репарирующих метаболических путей, что приводит к увеличению внутриклеточного содержания GSH, а с другой стороны - с активацией *Yap1*-зависимого сигнального механизма, который обеспечивает клетку необходимыми защитными ферментами и дополнительным количеством молекул GSH.

Таким образом, действие ДНК на внутриклеточный глутатионовый пул является результатом, как минимум, трёх эффектов. Во-первых: доксорубин препятствует окислению глутатиона в клетках *S. cerevisiae*, что является следствием генотоксического действия ДНК и опосредуется через активацию ДНК-репарирующих метаболических путей. Во-вторых: ДНК вызывает увеличение внутриклеточной концентрации GSSG и снижение отношения GSH/GSSG, что является результатом редокс-циклической активности ДНК. В-третьих: доксорубин вызывает увеличение общего содержания глутатиона в клетке (GSH+GSSG), что, вероятно, является следствием активации *Yap1*-зависимых сигнальных механизмов.

Литература

1. Minotti G., Menna P., Salvatorelli E., Cairo G., and Gianni L. // *Pharmacol. Rev.* 2004. Vol.56. P. 185-229.
2. Buschini A., Poli P., Rossi C. // *Mutagenesis.* 2003. Vol. 18. P. 26-36
3. Laurent G., and Jaffrezou J.-P. // *Blood.* 2001. Vol. 98. P. 913-923.
4. Lin Z.P., Belcourt M.F., Cory J.G., and Sartorelli A.S. // *J. Biol. Chem.* 2004. Vol. 279. P. 27030–27038.
5. Padovani, D., Mulliez E., and Fontecave M. // *J. Biol. Chem.* 2004. Vol. 276. P. 9587–9589.
6. Delaunay A., Pflieger D., Barrault M.-B., Vinh J., and Toledano M.B. // *Cell.* 2002. Vol. 111. P. 471-481.
7. Elledge S.J., Davis R.W. // *Genes Dev.* 1990. Vol. 4. P. 740–751.
8. Colleman S.T., Epping E.A., Streggerda S.M, and Moye-Rowley W.S. // *Mol. Cell. Biol.* 1999. Vol. 19. P. 8302-8313.
9. Berlin V., Brill J.A., Trueheart J. // *Methods in Enzymology.* 1991. Vol. 194. P. 774-792.
10. Gietz R.D., Woods R.A. // *Methods in Enzymology.* 2002. Vol. 350. P. 87-96.
11. Guarente L. // *Methods in Enzymology.* 1983. Vol. 101. P. 181-191.
12. Андреева А. И. // *Лабораторное дело.* 1988. Т. 41. С. 41-46.
13. Саенко Ю.В., Напалкова С.М., Шутков А.М., Селиванова О.С. // *Экспериментальная и клиническая фармакология.* 2005. Т. 6. С. 52-54.
14. Carmel-Harel O., Stearns R., Gasch A.P., Botstein D., Brown P.O., and Storz G. // *Mol. Microbiol.* 2001. Vol. 39. P. 595-605.
15. Dumond, H., Danielou N., Pinto M., and Bolotin-Fukuhara M. // *Mol. Microbiol.* 2000. Vol. 36. P. 830–845.