

ФАРМАКОГЕНЕТИКА

ВЛИЯНИЕ СИНТЕТИЧЕСКОГО АНТИОКСИДАНТА ТИОФАНА И ЭКСТРАКТА ТРАНСФОРМИРОВАННЫХ КОРНЕЙ ШЛЕМНИКА БАЙКАЛЬСКОГО НА ИНДУЦИРОВАННЫЙ МУТАГЕНЕЗ

О. В. Неупокоева¹, О. Л. Воронова¹, А. А. Чурин^{1, 2}, Н. И. Суслов^{1, 2}, И. В. Шилова¹

На модели повреждения генетических структур личинок *Dr. melanogaster* цисплатином и циклофосфаном изучены генопротекторные свойства синтетического антиоксидантного вещества тиофана и экстракта трансформированных корней шлемника байкальского (ЭШБ). При добавлении в питательную среду тиофана или ЭШБ отмечено снижение количества рекомбинантов *Dr. melanogaster* (самок, несущих рецессивные маркерные мутации yellow и/или singed).

Ключевые слова: циклофосфан; цисплатин; тиофан; экстракт корней шлемника байкальского; дрозофила; мутагенность.

ВВЕДЕНИЕ

SMART-тест позволяет интегрально оценить индукцию рекомбинационных, а также генных и хромосомных мутаций в соматических клетках *Dr. melanogaster* [8, 10]. Для изучения индуцированного мутагенеза целесообразно применять как прямые, так и непрямые мутагены. В настоящем исследовании в качестве прямого мутагена использовался цисплатин, а непрямого – циклофосфан (ЦФ) [2, 9, 11, 15]. Цисплатин и ЦФ используют в онкологической практике, они являются препаратами с изученными механизмами действия, что делает их удобной моделью в исследованиях становления и профилактики мутагенеза [2, 4, 15]. Как известно, одной из причин индуцированного мутагенеза является повышенный уровень перекисного окисления липидов (ПОЛ) и активных форм кислорода (АФК), что обуславливает необходимость поиска и разработки средств защиты генома среди антиоксидантов и средств растительного происхождения [3, 4].

Личинки *Dr. melanogaster* — объекты с активно пролиферирующими клетками, которые, в первую очередь, поражаются алкилирующими агентами, их метаболитами, продуктами ПОЛ и АФК, что делает их удобной и экономически выгодной тест-системой для оценки действия какого-либо мутагенного или антимутагенного фактора [8, 10, 13].

Целью данного исследования явилось изучение антимутагенных свойств антиоксиданта тиофана и экстракта трансформированных корней шлемника байкальского (ЭШБ) на различных моделях индуцированного мутагенеза.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В качестве тест-объекта индуцированных мутаций использовали селективную мутантную линию самцов *Dr. melanogaster* генотипа white/singed (w/sn, рецессивные гены, обуславливающие white — белую окраску глаз и singed — извитую скрученную форму щетинок) и мутантную линию самок генотипа yellow (y/y, y — рецессивный ген, обуславливающий развитие желтой окраски тела и щетинок), полученных с кафедры цитологии и генетики НИ ТГУ (Томск).

В случае возникновения генных или хромосомных нарушений на голове, тораксе и скутеллуме самок дрозофил регистрируют мутантные пятна и щетинки (макрохеты) фенотипа yellow или singed (рис. 1). Отмечают общее количество просмотренных самок (1000), число самок с одиночными (y, sn³) и двойными пятнами (y^{sn}) [1, 5, 8, 10]. Спонтанный уровень мутаций и рекомбинаций в данном тесте для данных линий *Dr. melanogaster* колеблется от 0,2 до 1,1 % [5]. Достоверность различий между группами с цитостатиками, группами с корректорами и с контролем определяли по критерию χ^2 с поправкой Йейтса [7].

В качестве индуктора мутагенеза использовали противоопухолевые препараты цисплатин-Эбеве (Эбеве Фарма, Австрия) в концентрации 0,009 и 0,0015 % и циклофосфан (комбинат «Биохимик», Саранск) в концентрации 0,03 %.

Для защиты структур наследственности применяли синтетическое антиоксидантное средство тиофан [бис(3-(3,5-ди-*трет*-бутил-4-гидроксифенил)пропил)-сульфид] (фонд “Биоантиоксидант”, Новосибирск, предоставлен для исследования А. Е. Просенко) [6]. Тиофан добавляли в питательную среду в концентрации 0,056 % в 1 % крахмальной слизи. В качестве корректора растительного происхождения использовали ЭШБ (И. Н. Кузовкина, Институт физиологии расте-

¹ НИИФирМ им. Е. Д. Гольдберга, 634028, Томск, пр. Ленина 3.

² НИ ТГУ, 634050, Томск, пр. Ленина, 36.

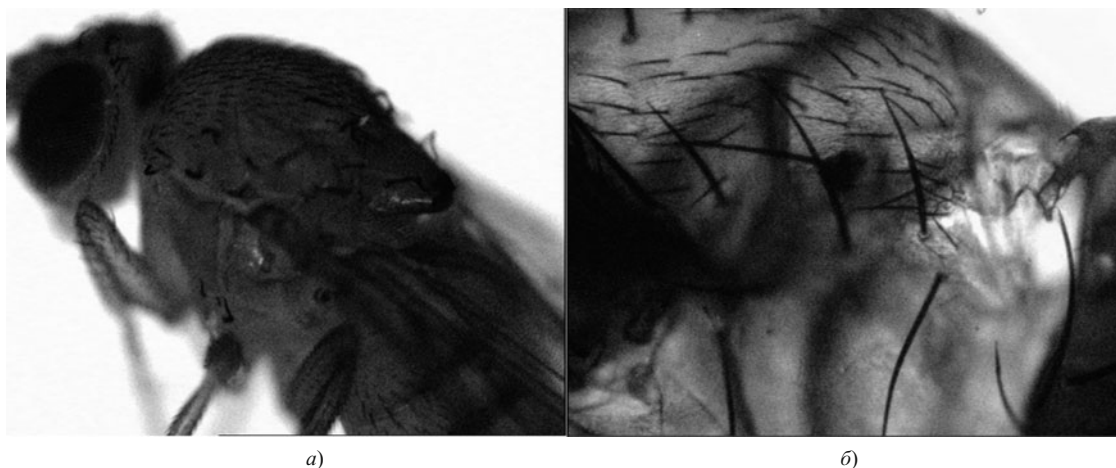


Рис. 1. Мутации “singed” и “yellow” у *Dr. melanogaster* после добавления цисплатина в питательную среду, $\times 150$.

ний РАН, Москва) [14]. ЭШБ представляет собой комплекс веществ, извлекаемых из сырья 70 % раствором этанола, и содержит 72 % вогонизида и вогонина (63,3 и 8,6 %, соответственно) от общего содержания флавонов. Экстракт вводили в концентрации 0,08 %. Применение данного средства обосновано его ранее показанным широким спектром биологических эффектов (иммуностимулирующее, гематостимулирующее, мембранотропное, антиоксидантное и др.) [12, 14]. В качестве контроля использовали дистиллированную воду.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В рамках исследования изучено влияние цисплатина в 2 концентрациях. Концентрация 0,009 % соответствовала дозе, ранее исследованной на мышах линии СВА/CaLac [1], концентрация 0,0015 % была оптимальной для моделирования мутагенеза у *Dr. melanogaster* с последующим проведением коррекции генотоксичности. Добавление цисплатина в концентрациях 0,009 и 0,0015 % в питательную среду, где находилась кладка яиц *Dr. melanogaster*, привело к тому, что у $(8 \pm 0,03) \%$ и $(4 \pm 0,03) \%$ самок, соответственно, были выявлены мутантные признаки, что в 16 и 8,2 раза превысило уровень контрольных значений. При этом значение χ^2 составило 67,83 и 26,28 (при $p < 0,0001$) (рис. 2, а). Полученные результаты дозозависимой мутагенности цисплатина подтверждают ранее проведенные исследования на *Dr. melanogaster*, но с использованием других маркерных мутаций [10, 11]. Кроме одиночных пятен “y” и “sn” обнаружены двойные пятна “ysn”. Появление одиночных и двойных пятен под влиянием цисплатина у *Dr. melanogaster* в SMART-тесте с применением маркеров mwh+/+flg ранее было выявлено в исследовании [13], что свидетельствует о том, что изучаемый цитостатик индуцирует митотическую рекомбинацию у личинок дрозофилы [13].

Как в эксперименте, где цисплатин добавляли в питательную среду в концентрации 0,009 %, так и при использовании этого цитостатика в меньшей концен-

трации (0,0015 %) выявлено количественное преобладание пятен “sn” над “y” (в 2,2 раза). Данный факт указывает на то, что именно этот участок хромосомы (приближенный к центромере) подвергался воздействию препарата, его метаболитов и продуктов перекисного окисления. При этом известно, что ген “y” расположен дальше от центромерного района, чем “sn”, и вероятность кроссинговера, как правило, максимальна в удаленных — теломерных участках. Вероятно, в данном случае имело место явление, когда происходящий кроссинговер в одном месте (в районе гена sn) подавляет кроссинговер в других участках хромосомы.

Таким образом, цисплатин нарушал структуру ДНК, индуцируя разрывы хромосом, что способствовало интенсивному обмену этими участками при кроссинговере. В зависимости от дозы цисплатина наблюдалось различное количество рекомбинантов, значительно превышающее уровень в контрольной серии. В контроле на 1000 исследованных самок дрозофилы обнаружено 5 особей $(0,5 \pm 0,03 \%)$ с мутантными рецессивными признаками, среди которых 1 особь несла фенотипическое проявление генетического нарушения в виде пятна “sn”, а 4 самки имели рецессивную мутацию “yellow”.

Применение ЦФ также способствовало возникновению повреждений в структуре хромосом дрозофил и, соответственно, формированию рекомбинантных особей, которых оказалось в 17 раз больше, чем в контроле и составило $(8,5 \pm 0,03) \%$ от общего количества изученных самок при значении $\chi^2 = 73,03$ (это больше 3,84 — критического значения для 5 % уровня значимости) (рис. 2, б). Обращает на себя внимание тот факт, что данный препарат индуцировал появление одиночных пятен “sn³” и “y” и не способствовал увеличению частоты двойных пятен “ysn³”. Известно, что размеры пятен зависят от стадии развития, на которой произошла рекомбинация. Чем раньше произошло это событие, тем больше будут размеры пятен (клонов) [8, 10, 13].

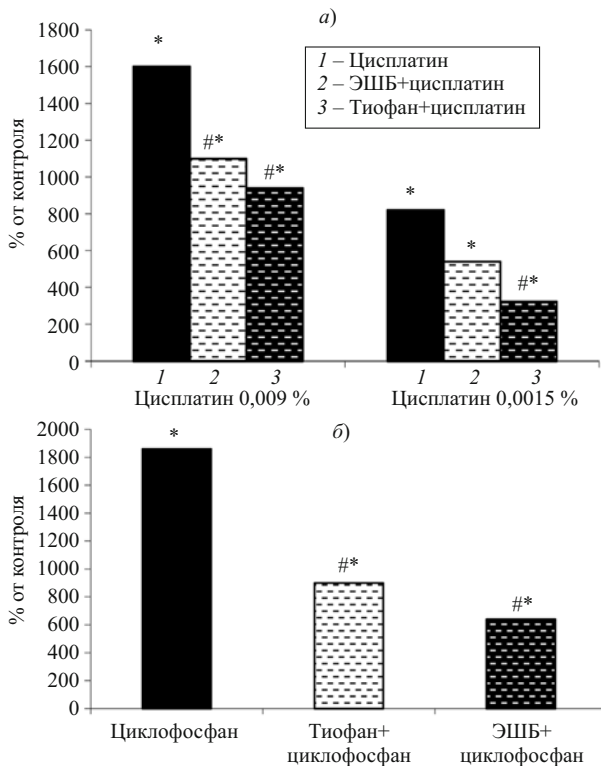


Рис. 2. Количество рекомбинантных особей *Dr. melanogaster* в SMART-тесте при индукции мутагенеза противоопухолевыми препаратами и его коррекция тиофаном и ЭШБ:

а) цисплатиновая модель мутагенеза у *Dr. melanogaster* в SMART-тесте и возможность фармакологической коррекции индуцированных нарушений с помощью тиофана и ЭШБ;

б) количество мозаичных самок *Dr. melanogaster* на циклофосфановой модели мутагенеза в SMART-тесте и при добавлении тиофана или ЭШБ в питательную среду.

Сравнение полученных данных с соответствующими значениями у контрольной группы: * (значение $\chi^2 > 3,84$, $p < 0,0001$) и сравнение полученных данных с соответствующими значениями группы, получившей корректоры и цитостатик с группой, получившей только цитостатик — # (значение $\chi^2 > 3,84$).

Наличие мозаичных особей, несущих малые одиночные пятна, свидетельствует о том, что рекомбинация произошла в более поздние сроки развития, когда заканчивалась личиночная стадия и началась куколичная. При окукливании прекращается контакт с пищей (средой), и интенсифицируются процессы органогенеза, развиваются ферментные системы [8, 10]. Токсичность ЦФ реализуется его активными метаболитами, возникающими в процессе метаболической активации соответствующими ферментами [4, 9]. В связи с тем, что индивидуальное развитие организма сопровождается радикальными изменениями в активности многих ферментных систем, имеются основания полагать, что система, осуществляющая метаболизм таких ксенобиотиков, как ЦФ у дрозофил имеет более поздние сроки созревания. Это согласуется с более поздним появлением реактивных метаболитов ЦФ, вызывающих нарушения целостности структуры хромосом личинок дрозофилы, и, соответственно, формированием мозаичных особей, несущих малые одиночные пятна.

При исследовании антимуtagenных свойств тиофана установлено, что выраженность его защитных эффектов зависит от дозы вводимого прямого мутагена цисплатина. Так, в серии экспериментов, где цитостатик применяли в концентрации 0,009 %, добавление тиофана в концентрации 0,056 % способствовало значительному снижению числа рекомбинантов (в 1,4 раза), по сравнению с группой, получившей только цисплатин. Мозаичных особей в группе, получившей тиофан с цитостатиком, зафиксировано ($5,5 \pm 0,030$) %, значение χ^2 при этом составило 5,02 ($> 3,84$) относительно группы, получившей один цисплатин (рис. 2).

Добавление тиофана в питательную среду с последующим введением цисплатина в концентрации 0,0015 % привело к появлению меньшего количества особей с фенотипическим проявлением рецессивных мутантных признаков, но значение χ^2 при этом составило 2,22 ($< 3,84$), что меньше допустимого 5 % уровня значимости (рис. 2, а).

Применение ЭШБ в концентрации 0,08 % оказало выраженный генопротекторный эффект при моделировании мутагенеза у личинок дрозофилы цисплатином как в концентрации 0,009, так и 0,0015 %. Количество рекомбинантных самок снизилось соответственно в 1,5 и 2,5 раза, по сравнению с экспериментальной группой цисплатина. Значение χ^2 составило при этом 6,68 и 10,78 ($> 3,84$) (рис. 2, а). Кроме того, в экспериментальной группе, получившей ЭШБ и 0,0015 % цисплатин, не было зафиксировано мозаичных самок с двойными пятнами “*ysn*”, что свидетельствует о генопротекторном эффекте ЭШБ на личинках дрозофилы, находящихся на самых ранних стадиях развития.

Добавление тиофана в концентрации 0,056 % в питательную среду с последующим введением 0,03 % ЦФ в 2,5 раза снижало количество мозаичных самок по сравнению с группой одного ЦФ. При этом значение χ^2 составило 26,68 ($> 3,84$) (рис. 2, б). Преимущественно были выявлены самки с одиночными рецессивными мутантными признаками “*y*”.

При применении ЭШБ в качестве средства защиты генома рекомбинантных особей возникало ($3,7 \pm 0,034$) % случаев мозаичности среди всех изученных самок, что в 2,3 раза меньше, чем в группе циклофосфана, значение χ^2 составило 17,45 ($> 3,84$) (рис. 3, б). Самок с двойными пятнами “*ysn*” зафиксировано не было, среди одиночных пятен преобладали пятна “*y*”. В экспериментальных группах с корректорами количество рекомбинантных самок было меньше, чем в группе с одним цитостатиком, но превышало число подобных особей в контроле.

Уменьшение количества мозаичных особей можно объяснить снижением интенсивности обменов гомологами хромосом, что, в свою очередь, зависит от частоты разрывов этих генетических структур. Снижение частоты разрывов хромосом обусловлено способно-

стью корректоров ингибировать процессы перекисного окисления липидов, в связи с чем уменьшается повреждающее действие активных радикалов на генетические структуры [6, 12, 14]. Использование тиофана и ЭШБ способствовало сохранению целостности хромосом и, соответственно, снижало вероятность обмена их фрагментами.

Таким образом, в SMART-тесте на *Dr. melanogaster* при применении цисплатин- и ЦФ-индуцированной модели мутагенеза, показана возможность фармакологической защиты генома развивающихся особей с помощью антиоксиданта тиофана и экстракта трансформированных корней шлемника байкальского.

ВЫВОДЫ

1. В SMART-тесте на *Dr. melanogaster* с применением маркерных мутаций “yellow” и “singed” выявлены генотоксические эффекты цисплатина и ЦФ. Мутаген прямого действия цисплатин в изученных концентрациях повреждает генетические структуры на самых ранних этапах развития личинок и индуцирует появление обширных “*usn*³” мутантных пятен. ЦФ вызывает нарушения на более поздних сроках развития особей, что фенотипически проявляется появлением малых одиночных пятен “*y*” и “*sn*³”.

2. Тиофан и экстракт шлемника байкальского значительно снижают повреждающее действие противоопухолевых препаратов на генетические структуры соматических клеток личинок дрозофил. В отличие от тиофана экстракт шлемника байкальского предупреждает повреждение хромосом цисплатином на самых ранних сроках развития особей.

ЛИТЕРАТУРА

1. О. Л. Воронова, О. В. Неупокоева, *Эксперим. и клин. фармакол.*, **73**(10), 37 – 39 (2010).
2. М. И. Давыдов, *РТС-2004*, Москва (2004).
3. А. Д. Дурнев, А. К. Жанатаев, *Молек. мед.*, № 3, 3 – 19 (2013).
4. В. И. Каледин, В. П. Николин, Н. А. Попова, *Докл. Академии наук*, **420**(4), 568 – 570 (2008).
5. А. Н. Миронов, *Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств*, Гриф и К, Москва (2012).
6. А. Е. Просенко, Е. И. Терах, О. И. Дюбченко и др., *Биоантиоксидант: Тез. докл. VII Международ. конф.*, РУДН, Москва (2006), сс. 228 – 230.
7. Н. В. Трухачева, *Математическая статистика в медико-биологических исследованиях с применением пакета Statistica*, ГЭОТАР-Медиа, Москва (2012).
8. M. Ashburner, K. G. Golic, and R. S. Hawley (eds.), *Drosophila. A Laboratory Handbook*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York (2005).
9. L. Clarke, D. J. Waxman, *Cancer Res.*, **49**, 2344 – 2350 (1989).
10. H. Frei, F. E. Wiirgler, *Mutat. Res.*, **334**, 247 – 258 (1995).
11. D. García Sar, M. Montes-Bayón, L. Aguado Ortiz, et al., *Anal. Bioanal. Chem.*, **390**, 37 – 44 (2008).
12. W.-H. Huang, A.-R. Lee, C.-H. Yang, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **70**(10), 2371 – 2380 (2006).
13. A. J. Katz, *Environment. Molec. Mutagen.*, **10**, 197 – 203 (1987).
14. I. N. Kuzovkina, I. E. Al'terman, V. E. Karandashov, *Biology Bul.*, **31**(3), 255 – 261 (2004).
15. H. Nau, H. Spielmann, Lo T. Morter, et al., *Mutat. Res.*, **95**, 105 – 118 (1982).

Поступила 06.03.15

EFFECT OF SYNTHETIC ANTIOXIADNT THIOPHAN AND SCUTELLARIA BAICALENSIS ROOT EXTRACT ON DRUG-INDUCED MUTAGENESIS

O. V. Neupokoeva¹, O. L. Voronova¹, A. A. Churin^{1,2}, N. I. Suslov^{1,2}, and I. V. Shilova¹

¹ Institute of Pharmacology, Siberian Branch, Russian Academy of Medical Sciences. pr. Lenina 3, Tomsk, 634028 Russia

² Tomsk State University, pr. Lenina 36, Tomsk, 634050 Russia

Gene protective properties of synthetic antioxidant thiophane and the extract of *in vitro* cultivated roots of *Scutellaria baicalensis* were studied on the model of *Dr. melanogaster* larvae genetic structure damage by drugs cisplatin and cyclophosphan (cyclophosphamide). It is established that adding thiophane or *Scutellaria baicalensis* root extract to a nutrient medium leads to a decrease in amount of *Dr. melanogaster* recombinants (females bearing recessive yellow and/or singed marker mutations).

Keywords: cyclophosphan; cisplatin; thiophane; *Scutellaria baicalensis*; root extract; *Dr. melanogaster*; mutagenicity.