

## ГЕНОТОКСИЧЕСКИЙ ЭФФЕКТ АМИНОПТЕРИНА И МЕТОТРЕКСАТА НА ФЕРТИЛЬНОСТЬ РЯДА ЛИНИЙ ДИКОГО ТИПА *DROSOPHILA MELANOGASTER*

С. В. Шихова

Уральский Федеральный Университет им Б.Н. Ельцина

Поступила в редакцию 29.12.2016 г.

**Аннотация.** В работе представлены результаты исследования по ряду признаков, характеризующих генотоксический эффект (плодовитость, жизнеспособность, смертность на стадии раннего, позднего эмбриогенеза, куколки и личинки), у семи линий дикого типа *D. melanogaster* при воздействии цитостатических препаратов аминоптерина (АП) и метотрексата (МТ). Установлено влияние цитостатических препаратов на среднюю индивидуальную плодовитость и жизнеспособность дрозофилы на различных этапах развития, а так же межлинейные различия по данным признакам. Отмечено влияние отбора на фоне химического стресса, в качестве адаптивного механизма.

**Ключевые слова:** *Drosophila melanogaster*, цитостатические препараты, аминоптерин, метотрексат, адаптация, генотоксикология, плодовитость, жизнеспособность, летальность.

**Abstract.** In the paper was presents the results of a study on several grounds that characterize the genotoxic effect (fertility, vitality, mortality at early stage, late embryogenesis, larvae and pupae), in seven lines of wild type *D. melanogaster* that were exposed to treatment of cytotoxic drugs aminopterin (AP) and methotrexate (MT). The effects of cytotoxic drugs on the average individual fecundity and viability of *Drosophila* at different stages of development were traced. Interline differences according to the grounds were studied. The effect on selection background of chemical stress, as an adaptive mechanism were marked.

**Keywords:** *Drosophila melanogaster*, cytotoxic drugs, aminopterin, methotrexate, adaptation, genotoxicity, fertility, vitality, mortality.

В современной биологии одной из важных проблем является изучение генетических механизмов адаптации и факторов на них влияющих, что требует от исследователей комплексного подхода. Эта область исследований связывает между собой такие разделы биологии как физиология, эмбриология, генетика, токсикология и многие другие. С механизмами адаптации к факторам окружающей среды связано понятие так называемого генотоксического эффекта. В данной работе, под термином генотоксический эффект подразумевается влияние исследуемого вещества на функционирование генов, на уровне надгенных механизмов (например, активности мобильных генетических элементов, влияние изменения микро-окружения на работу генов, а именно экспрессивность и пенетрантность).

Практически для любого лекарственного лечения существует баланс между эффективностью и токсичностью. Это особенно справедливо в отношении лечения многих форм рака, которое зачастую не специфично и влечет за собой угрозу всем быстро делящимся клеткам со стороны различных химиотерапевтических агентов. Терапевтическую эффективность многих химиотерапевтических процедур можно улучшить за счёт достижения баланса между эффективностью и токсичностью, а так же, улучшения специфических свойств препарата, по отношению к клеткам опухоли. Для тестирования препаратов для химиотерапии в настоящее время существует множество способов, которые условно можно разделить на две большие группы *invitro* и *invivo*. Первая группа включает в себя модели, с использованием культур клеток. Вторая группа более разнообразна и может включать в себя перевива-

емые культуры клеток, а так же спонтанные мутации. Наиболее приближённой к естественным условиям считается модель, которая задействует спонтанные мутации [1].

Основной проблемой генетической токсикологии является оценка риска возникновения мутаций в соматических и половых клетках при воздействии химических веществ. Это могут быть не только вещества, загрязняющие окружающую среду, но так же, к примеру, фармакологические препараты, с теми или иными целями, вводимые в организм. Невозможность проведения прямой оценки мутагенной опасности химических соединений непосредственно у человека привела к созданию различных экспериментальных методов оценки этой опасности, получившей название тест-систем. В качестве тест-организмов для регистрации мутагенных эффектов, в настоящее время используется более 200 видов, как прокариотных, так эукариотных организмов. Одним из таких, широко используемых организмов, является *Drosophila melanogaster* [2].

Расшифровка геномов человека и дрозофилы показали, что более 50% генов *Drosophila melanogaster* имеют гомологов у человека, и в то же время не менее 60-70% генов наследственных болезней человека имеют своих двойников у *Drosophila melanogaster* [3]. В том числе и многие сигнальные пути дрозофилы и позвоночных, в том числе и человека, которые задействованы при ответе на токсическое поражение аминоксантином и метотрексатом (а так же, некоторыми другими химиотерапевтическими агентами) схожи [4].

В настоящее время, разрабатывается множество различных подходов, к вопросу моделирования генотоксического эффекта на дрозофиле, как в России, так и за рубежом. Процедура одного из тестов, а именно теста на рецессивные, сцепленные с полом летальные мутации с использованием лабораторной линии Меллер-5, закреплена в Правилах организации по экономическому сотрудничеству и развитию (ОЭСР, № 477 от 4 апреля 1984 г.). Однако, и другие методики достойны внимания, в частности методы, основанные на исследовании мутационной активности соматических клеток крыла, [5, 6] а так же, методы, базирующиеся на исследовании экспрессивности доминантных летальных мутаций [7]. Представляется перспективной разработка новых процедур и методик, для изучения генотоксического эффекта, с использованием в качестве модельного организма дрозофилы.

Целью исследования является изучение генотоксического эффекта цитостатических препаратов аминоксантина и метотрексата, с применением разработанной модели, базирующейся на учёте плодовитости и летальности на разных этапах развития *D. melanogaster*.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В данном исследовании использовались следующие линии дикого типа *D. melanogaster*: “Canton-S”, “Oregon-R” — лабораторные линии дрозофилы. “Host”, “Джованни” - природные линии дикого типа дрозофилы, были отловлены в г. Екатеринбург в разные годы. “Белгород”, “Новый Свет”, “Челябинск” - природные линии, были отловлены в соответственных населённых пунктах в разное время.

Цитостатические препараты аминоксантин и метотрексат вносились в среду Альтерстона (полусинтетическая среда для выращивания дрозофилы, содержащая глюкозу, дрожжи и агар-агар) в концентрации 400 мкг/кг среды. Второе поколение не подвергалось обработке цитостатическими препаратами.

Исследуемые линии дрозофилы содержались в банках для массовых кладок, с агаровыми пластинами на дне. Вылупившиеся личинки первого возраста (с 1 по 24 часы жизни) помещались на среду с образцами цитостатических препаратов, где они претерпевали весь цикл развития вплоть до вылета имаго. Таким образом, изучаемый образец цитостатического препарата вводился с пищей, в течение всего времени развития личинок.

Для изучения средней индивидуальной плодовитости (СИП) нами было использовано 20 индивидуальных культур на протяжении 11 дней. Яйца от каждой пары особей помещались на агаровые пластинки. Частота эмбриональных леталей определялась спустя пять дней. С этой целью подсчитывалось количество неразвившихся яиц, которые подразделялись на две категории: яйца бурого цвета – поздние эмбриональные летали (ПЭЛ), яйца белого цвета – ранние летали и неоплодотворенные яйца (РЭЛ).

Постэмбриональные летали (личиночные (ЛЛ) и куколочные (КЛ)) определялись путём прямого подсчёта числа неразвившихся личинок и куколок, разработанным в лаборатории экологической генетики УрФУ. Число личиночных постэмбриональных леталей выражается в % летальных личинок от общего количества исследуемых личинок. Число куколочных леталей выражается в % летальных куколок от общего количества куколок

Полученные данные обрабатывались в программе Statistica 13.0, методом парного сравнения с контролем, с использованием Т-критерия Стьюдента, при уровне значимости  $P < 0.05$ .

### ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ.

Сравнительный анализ средней индивидуальной плодовитости семи линий дикого типа *D. melanogaster*, обработанных цитостатическими препаратами, показал наличие значительного угнетающего эффекта данных соединений на фертильность дрозофилы (см. рис 1, 2). Данный эффект являлся ожидаемым, и соответствует литературным данным.

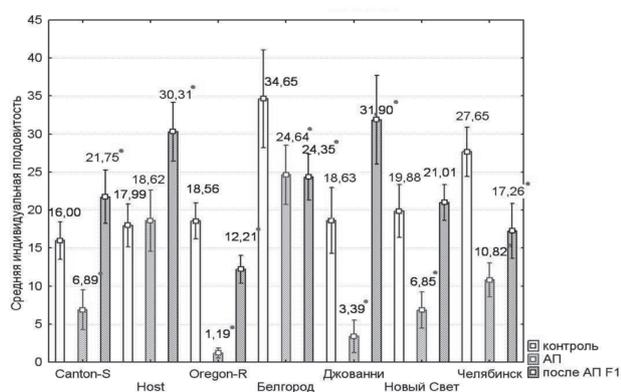


Рис. 1. Средняя индивидуальная плодовитость линий дикого типа *D. melanogaster*, в контроле и после обработки аминокперинем. (Точкой показаны статистически значимые различия, при сравнении с контрольной группой).

Аминоптерин и метотрексат долгое время применялись как препараты, блокирующие клеточное деление и вызывающие апоптоз клеток опухоли, в частности для лечения некоторых форм лейкозов. Было показано, что они выступают в роли ингибитора дигидрофолатредуктазы, так как являются конкурентом его основного субстрата – фолиевой кислоты [7 – 9]. Данные цитостатические препараты замедляют клеточное деление, за счёт создания дефицита пуриновых нуклеотидов, необходимых для деления клеток, в том числе и ооцитов [10]. Оба цитостатика оказывают серьезное воздействие на женскую репродуктивную систему *D. melanogaster* [7].

В ходе работы, удалось обнаружить различия в эффекте, оказываемом на фертильность дрозофилы, у исследуемых препаратов. После обработки аминокперинем 6 из 7 исследуемых линий показали статистически значимое снижение средней индивидуальной плодовитости. Это линии

дикого типа “Canton-S”, “Oregon-R”, “Белгород”, “Джованни”, “Новый Свет” и “Челябинск”. В то время как, после обработки метотрексатом лишь 3 из 7 линий дикого типа демонстрируют статистически значимое снижение средней индивидуальной плодовитости. Это линии дикого типа “Host”, “Джованни”, “Новый Свет”. Исходя из полученных данных, можно утверждать, что аминокперин является более токсичным препаратом, чем метотрексат. Прямых литературных данных, по которым можно судить, о верности этого утверждения нет. Однако, из-за высокой токсичности, в настоящее время, аминокперин не применяется в качестве цитостатического препарата, а метотрексат все ещё используется, например, для лечения псориаза.

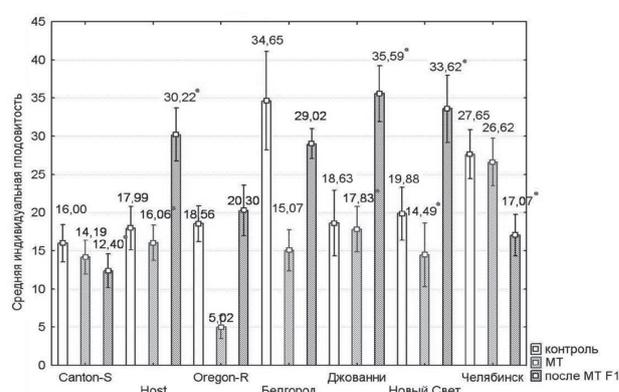


Рис. 2. Средняя индивидуальная плодовитость линий дикого типа *D. melanogaster*, в контроле и после обработки метотрексатом. (Точкой показаны статистически значимые различия, при сравнении с контрольной группой).

Линии дикого типа *D. melanogaster* по-разному реагируют на химический стресс, вызванный цитостатическими препаратами, что может быть обусловлено генетическими особенностями каждой из исследуемых линий, такими как генетическое разнообразие. Самое значительное снижение плодовитости в ответ на обработку цитостатическими препаратами показала линия дикого типа “Oregon-R”, в ответ на обработку аминокперинем. Кроме количественного снижения плодовитости у данной линии наблюдалось уменьшение размеров яиц, укорочение хорионотических придатков, как это было описано в литературном источнике [7]. Данная линия является хорошо изученной лабораторной инбредной линией с наименьшим генетическим разнообразием. Поэтому, её ответ на химический стресс оказался наиболее выраженным.

Для изучения адаптационных механизмов был проведён анализ средней индивидуальной плодовитости особей второго поколения, которые не получали с пищей цитостатических препаратов, но являлись прямыми потомками особей, обработанных цитостатическими препаратами. Все линии демонстрируют тенденцию к увеличению плодовитости, в сравнении с их родителями, которые получали цитостатические препараты с пищей. Однако, некоторые линии дикого типа (“Canton-S”, “Host”, “Джованни” после воздействия аминоптерина, и “Host”, “Джованни”, “Новый Свет” после воздействия метотрексата) демонстрируют статистически значимое возрастание значения средней индивидуальной плодовитости, по сравнению с контрольными линиями. Значение средней индивидуальной плодовитости остальных линий или не имеет статистически значимых различий с

контролем (у линии дикого типа “Новый Свет” после воздействия аминоптерина, и линии “Oregon-R”, после метотрексата), либо наблюдается статистически значимое снижение данного показателя (у линий “Oregon-R”, “Белгород”, “Челябинск” после воздействия аминоптерина, и линий “Canton-S”, “Челябинск” после воздействия метотрексата). Таким образом, в данном случае, интенсивность адаптации так же проявляет межлинейные различия.

Изучение смертности на различных стадиях развития дрозофилы, показало, что цитостатические препараты вызывали статистически значимое увеличение данного показателя, на примере некоторых линий, либо значимых различий с контролем не наблюдалось (см. таблицу 1). Данные результаты являлись ожидаемыми, исходя из биологического эффекта, который оказывают аминоптерин и метотрексат на организм [7].

Таблица 1.

*Летальность на различных стадиях развития линий дикого типа D. melanogaster в контроле и после обработки цитостатическими препаратами. (Звёздочкой и полужирным шрифтом показаны статистически достоверные различия, в сравнении с контрольной группой).*

ЛИНИЯ	РЭЛ	±ст. откл.	ПЭЛ	±ст. откл.	ЛЛ	±ст. откл.	КЛ	±ст. откл.
Canton-S контроль	4.97	6.28	2.09	2.76	29.24	5.68	1.54	0.40
Canton-S АП	8.84	6.95	3.09	3.52	30.51	9.94	3.69	2.15
Canton-S после АП F1	20.72	8.51	3.26	1.07	24.42	5.54	5.04	2.20
Canton-S МТ	1.42	1.08	0.85	0.58	31.66	9.62	3.19	1.63
Canton-S после МТ F1	20.53	9.80	2.57	2.21	24.83	7.33	4.33	1.99
Host контроль	2.20	2.52	1.16	1.51	23.29	3.22	2.51	0.57
Host АП	<b>6.03 *</b>	5.24	1.76	1.50	23.18	3.75	2.08	1.08
Host после АП F1	4.10	2.72	2.01	1.08	26.92	5.76	<b>5.74 *</b>	2.00
Host МТ	1.08	1.20	0.97	0.94	<b>31.52 *</b>	4.69	<b>4.03 *</b>	1.31
Host после МТ F1	<b>10.48 *</b>	4.86	<b>2.45 *</b>	1.01	26.25	4.93	<b>5.42 *</b>	1.91
Oregon-R контроль	4.50	3.60	1.57	1.84	41.57	2.72	9.80	1.83
Oregon-R АП	<b>24.53 *</b>	12.82	<b>6.27 *</b>	6.62	<b>50.08 *</b>	5.68	11.04	3.26
Oregon-R после АП F1	3.00	2.22	1.11	1.29	40.50	5.30	<b>4.95 *</b>	2.31
Oregon-R МТ	<b>17.56 *</b>	8.54	<b>3.14 *</b>	1.53	<b>45.33 *</b>	3.08	11.54	4.00
Oregon-R после МТ F1	6.62	5.98	<b>3.75 *</b>	2.74	<b>33.85 *</b>	6.55	<b>4.46 *</b>	1.96
Белгород контроль	5.78	3.99	1.86	1.50	21.72	5.05	1.49	0.53
Белгород АП	4.11	1.52	1.69	1.78	25.04	5.16	2.42	1.07
Белгород после АП F1	8.16	6.54	3.76	3.43	30.25	13.80	<b>2.9 *</b>	1.29
Белгород МТ	2.73	3.01	1.21	1.13	27.12	5.52	<b>4.76 *</b>	1.66
Белгород после МТ F1	6.39	6.88	3.08	3.42	20.97	11.64	4.10	2.86
Джованни контроль	1.95	2.27	0.42	0.61	44.73	3.32	7.77	1.75
Джованни АП	<b>15.01 *</b>	9.33	<b>3.27 *</b>	2.93	47.52	4.16	<b>13.32 *</b>	4.75
Джованни после АП F1	3.79	2.68	0.71	0.60	47.33	3.11	5.79	1.89
Джованни МТ	<b>7.48 *</b>	2.94	<b>2.79 *</b>	2.02	47.81	3.82	<b>14.78 *</b>	4.68
Джованни после МТ F1	<b>4.92 *</b>	2.48	<b>2.05 *</b>	1.34	41.07	8.29	8.84	2.35
Новый Свет Контроль	2.02	0.74	1.95	1.65	42.31	9.25	2.33	0.66
Новый Свет АП	4.40	4.38	1.35	1.88	45.59	5.99	2.75	0.69
Новый Свет после АП F1	2.69	2.91	2.36	2.28	46.38	3.17	<b>5.0 *</b>	0.86
Новый Свет МТ	5.39	7.92	1.70	1.28	41.97	3.81	<b>1.23 *</b>	0.79
Новый Свет после МТ F1	1.79	1.13	<b>0.8 *</b>	0.40	42.55	3.26	3.79	1.61
Челябинск контроль	2.82	3.51	0.51	0.42	41.95	2.72	1.33	0.45
Челябинск АП	4.52	6.23	1.72	2.35	45.98	5.33	<b>1.96 *</b>	0.27
Челябинск после АП F1	2.03	2.56	<b>1.46 *</b>	1.16	44.01	5.24	1.90	0.83
Челябинск МТ	4.73	1.94	0.64	0.31	45.23	11.08	1.70	0.42
Челябинск после МТ F1	2.61	2.05	0.98	0.63	<b>46.11 *</b>	3.00	1.92	0.61

Статистически значимое повышение летальности на стадии раннего эмбриогенеза (РЭЛ), под воздействием аминоптерина, наблюдается у 3 линий дикого типа дрозофилы из 7. Это линии “Host”, “Джованни”, “Oregon-R”. После обработки метотрексатом мы наблюдали статистически значимое увеличение РЭЛ у 2 линий дикого типа “Джованни” и “Oregon-R”. На стадии позднего эмбриогенеза (ПЭЛ), после обработки обоими образцами цитостатических препаратов, две линии дикого типа дрозофилы демонстрируют статистически значимое увеличение числа леталей “Джованни” и “Oregon-R”. На стадии личинки увеличение числа леталей, в ответ на обработку аминоптеринем демонстрирует линия дикого типа “Oregon-R”, а в ответ на обработку метотрексатом – линии дикого типа “Oregon-R”, “Челябинск”, “Host”. На стадии куколки, после обработки аминоптеринем, статистически значимое увеличение числа леталей было установлено у линий дикого типа “Джованни” и “Челябинск”, а после обработки метотрексатом у линии дикого типа “Host”. Исходя из полученных данных, можно утверждать, что межлинейные различия значительно влияют на чувствительность к цитостатическим препаратам. Кроме того, мы не можем установить, какой из исследуемых цитостатических препаратов сильнее воздействует на экспрессивность и пенетрантность летальных генов.

Мы можем наблюдать снижение ранних и поздних эмбриональных леталей, во втором поколении, по сравнению с первым поколением, в отсутствие обработки цитостатическими препаратами (см таблицу 1) у линий дикого типа “Oregon-R”, “Джованни”, “Новый Свет” и “Челябинск”. Однако, линии дикого типа “Host”, “Белгород” и “Canton-S”, демонстрируют противоположный результат.

Во многих случаях, достоверных различий с контролем, по числу леталей у второго поколения, не получавшего цитостатические препараты с пищей, не наблюдалось. У линии дикого типа “Oregon-R” наблюдалось снижение числа поздних эмбриональных, а так же личиночных и куколочных леталей, во втором поколении, после обработки метотрексатом, а так же, снижение поздних эмбриональных леталей, во втором поколении, после обработки аминоптеринем. В данном случае, мы можем говорить об адаптивных механизмах на уровне отбора. В некоторых случаях, линии дикого типа дрозофилы демонстрировали увеличение числа леталей, у второго поколения, после

обработки цитостатическими препаратами. Наблюдаемое увеличение летальности могло быть весьма значительно, как в случае с линией дикого типа “Host”, которая во втором поколении демонстрирует значительное увеличение куколочных леталей, даже по сравнению с родительским поколением, непосредственно обработанным цитостатическими препаратами.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В ходе работы, было обнаружено статистически значимое снижение плодовитости у 6 из 7 исследуемых линий дикого типа *D. Melanogaster*, при воздействии аминоптерина, и 3 из 7 исследуемых линий дикого типа *D. Melanogaster*, при воздействии метотрексата. Таким образом, на данный показатель аминоптерин оказывает большее токсическое воздействие, чем метотрексат.

Обработка цитостатическими препаратами привела к статистически значимому увеличению летальности у линий дикого типа “Oregon-R”, “Белгород”, “Джованни”, “Новый Свет”, “Host”, и “Челябинск”, на различных стадиях развития. Исходя из полученных результатов, можно сделать вывод, что генетические различия между исследуемыми линиями играют большую роль, в ходе формирования ответа на химический стресс. Для создания адекватной модели предпочтительнее всего использование изогенных линий, с наименьшим генетическим разнообразием. Одна из линий, использованных в данной работе, отвечает заявленным критериям, это линия дикого типа “Oregon-R”.

Наблюдаемые в работе адаптивные механизмы базируются в первую очередь на изменении экспрессивности и пенетрантности летальных генов, вызванных отбором на фоне химического стресса.

*Исследование поддержано программой 211 Правительства Российской Федерации, соглашение № 02.A03.21.0006 Supported by Act 211 Government of the Russian Federation, agreement № 02.A03.21.0006*

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Попова Н. А. Модели экспериментальной онкологии / Н. А. Попова // Соросовский образовательный журнал. — 2000. — Т. 6, №. 8. — С. 33-38.
2. Абилов С. К., Глазер В. М. Мутагенез с основами генотоксикологии: учебное пособие. / С. К. Абилов, В. М. Глазер — М.; Спб.: Нестор-История, 2015. — 304 с.
3. Саранцева В. С., Шварцман А. Л. Болезнь Альцгеймера – амилоидоз или дисфункция синап-

Шихова С. В.

сов? Уроки моделирования на *Drosophila melanogaster* / В. С. Саранцева, А. Л. Шварцман // Ecological genetics. — 2005. — Т. 3, № 4. — С. 19–25.

4. The genetic architecture of methotrexate toxicity is similar in *Drosophila melanogaster* and humans / Kislukhin G. [et al.] // G3: Genes|Genomes|Genetics. — 2013. — Т. 3. — №. 8. — С. 1301–1310.

5. Genotoxic and antigenotoxic assessment of chios mastic oil by the in vitro micronucleus test on human lymphocytes and the in vivo wing somatic test on *Drosophila*. / D. Vlastos [et al.] // PloS one. — 2015. — Т. 10. — №. 6, режим доступа: <http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0130498> (дата обращения 30.01.17).

6. Антосюк О. Н. Воздействие метотрексата на соматические клетки крыла на примере модельного объекта *Drosophila melanogaster* / О.

Н. Антосюк // Биофармацевтический Журнал. — 2016. — Т. 8, №. 4. — С. 14–19.

7. The effects of methotrexate on *Drosophila* development, female fecundity, and gene expression / J. G. Affleck, [et al.] // Toxicological Sciences. — 2006. — V. 89, № 2. — P. 495–503.

8. Wolfgang W. J. Exploring Protection from Methotrexate-Induced Terato-genicity in Flies / W. Wolfgang // Toxicological Sciences. — 2007. — V. 99, №2. — P. 363–365.

9. In Vivo Analysis of *Drosophila* Deoxyribonucleoside Kinase Function in Cell Cycle, Cell Survival and Anti-Cancer Drugs Resistance / J. Silber [at al.] // Cell Cycle, 2006. — V.7 — P. 740–749.

10. Коваленко Л. В. Биохимические основы химии биологически активных веществ / Л. В. Коваленко — М.: Бином. Лаборатория знаний, 2012. — 137 с.

Уральский Федеральный Университет им  
Б.Н. Ельцина

Шихова С. В., аспирант кафедры зоологии

Тел.: +7 (982) 641-21-04

E-mail: simigr@yandex.ru

Ural Federal University named after B.N.Yeltsin

Shikhova S. V., graduate student.

Ph.: +7 (982) 641-21-04

E-mail: simigr@yandex.Ru