

УДК 57.08 :

DROSOPHILA MELANOGASTER КАК МОДЕЛЬНЫЙ ОБЪЕКТ ПРИ ИЗУЧЕНИИ БИОЛОГИЧЕСКОГО ЭФФЕКТА МЕТОТРЕКСАТА (METHOTREXATE)

О.Н. Антосюк, А.М. Марвин

ФГАОУ ВПО УрФУ имени первого президента
России Б.Н. Ельцина, 620002, г. Екатеринбург,
Российская Федерация

Метотрексат используется активно в медицинской практике, в частности при химиотерапии. Являясь ингибитором дигидрофолатредуктазы, влечет за собой 1 и 2-цепочечные разрывы ДНК, неправильное метилирование. Использовались 3 линии дикого типа *Drosophila melanogaster*. В качестве фактора химического стресса использовался метотрексат (400 мкг/кг среды). Длительная селекция привела к изменению локализации и площади очагов апоптоза в крыловом имагинальном диске в присутствии метотрексата. Вероятно, различия в чувствительности линий связаны с различной активностью компарментов в крыловом имагинальном диске, а также различным количеством копий *hobo*-элемента.

Ключевые слова: метотрексат, *hobo*, морфометрический анализ, дигидрофолатредуктаза.

Введение. В ряде работ описывается генотоксический эффект, вызванный различными химическими препаратами на различных модельных объектах, в том числе и на дрозофиле [1]. Наибольший практический интерес среди препаратов химического стресса представляют цитостатические препараты, активно используемые в медицинской практике. В данном исследовании использовался метотрексат (Methotrexate) - ингибитор дигидрофолатредуктазы, что негативно сказывается также и на фолатном цикле, в том числе и у человека. Нарушение метаболизма фолатов влияет на стабильность ДНК за счет подавления синтеза тимидилатов и, как следствие, происходят 1 и 2-цепочечные разрывы цепи либо недостаточное метилирование ДНК, с последующей неправильной генной экспрессией [2]. Недостаточное метилирование определенных регионов генов – супрессоров опухолей может вызвать трансформацию клеток, что является основой для канцерогенеза. Эффект метотрексата проявляется в более активном апоптозе в крыловом имагинальном мезоторакальном диске, что впоследствии выражается в изменении параметров крыла у имаго [3]. Таким образом, используемый нами морфометрический анализ крыла по 24 показателям позволяет оценить изменения в крыле, вызванные воздействием факторов стресса различной природы.

Исходя из всего вышесказанного, целью данных исследований являлось проанализировать тератогенный эффект и нестабильность генома у линий дикого типа *Drosophila melanogaster* в условиях химического стресса, вызванного метотрексатом, используя ряд следующих показателей:

1. Оценка жизнеспособности: средняя индивидуальная плодовитость (СИП), частота эмбриональной гибели особей на ранних и поздних этапах развития.
2. Оценка частоты хемоморфозов типа «вырезка» на крыле.
3. Морфометрический анализ крыла по 24 показателям: линейные и двумерные параметры крыловой пластинки.
4. Определение копийности *hobo*-элемента и *hobo*-подобных элементов в линиях дикого типа с использованием полимеразно-цепной реакции (ПЦР).

Материалы и методы исследования. В работе были использованы 3 линии дикого типа *Drosophila melanogaster*, отловленные в природе и впоследствии культивируемые в лабораторных условиях: Биос-3 (Двуреченск, 2007), Белгород (Белгород, 2006), Host (Екатеринбург, 2005). Все три линии помещались на среду Альдерстона, содержащую метотрексат (400 мкг/кг среды), где в течение всего периода развития получали препарат

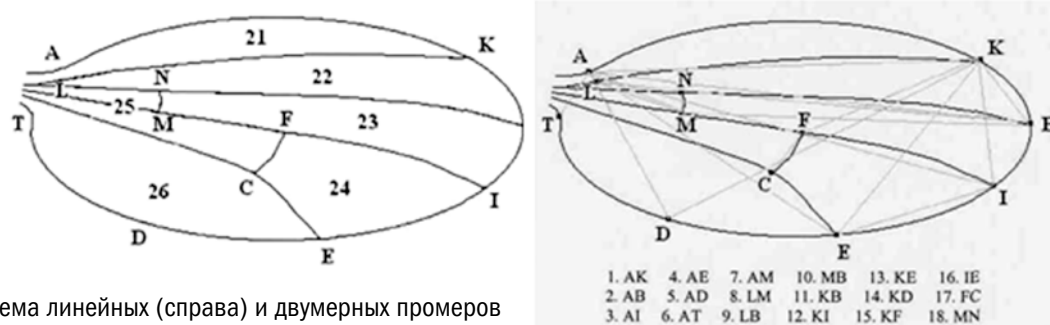


Рис. 1. Схема линейных (справа) и двумерных промеров (площади ячеек крыла(слева)) морфометрического анализа крыловой пластинки *Drosophila melanogaster*.

трофическим путем. После содержания на среде с метотрексатом следующее поколение культивировалось на чистой среде. Таким образом, чередовалось культивирование на чистой среде и на среде с цитостатиком. Подобное культивирование позволяло пронаблюдать процессы онтогенетической и генотипической адаптации. После вылета имаго, содержащихся весь цикл развития на среде с метотрексатом, разнополые особи попарно культивировались в пробирках. Ежедневно в течение 10-14 подводился подсчет СИП, а также частота эмбриональной гибели потомства на ранних и поздних этапах развития. Затем крылья 25 особей фотографировались камерой Nikon Coolpix 4500 для морфометрического анализа крыла по 18 линейным параметрам, а также по 6 двумерным (рис.1). Анализ выполнялся при помощи программы Universal Desktop Ruler, а полученные промеры обрабатывались при помощи программы Statistics 6.0 с использованием дискриминантного анализа с критическим уровнем значимости $p \leq 0,05$. Результаты, полученные при подсчете СИП и частоты ранней и поздней эмбриональной гибели особей, обрабатывались в программе Statistics 6.0 критерием Стьюдента ($p \leq 0,05$). На основе полученных результатов дискриминантного анализа морфометрических данных, подтверждающих косвенно нестабильность генома, определялась копияность *hobo* и *hobo*-подобных элементов прямыми методами. Копийность *hobo* элементов в 9 генотипах

дрозофилы оценивали методом ПЦР в реальном времени с праймерами к последовательности *hobo* элемента и гена *scalloped*. Объем реакционной смеси для ПЦР составлял 20 μ л. В ее состав входили матричная ДНК, 1.5 U полимеразы, буфер (концентрация Mg^{++} в 1x буфере составляет 2,5мМ) и 5мкМ каждого dNTP, 10пкМ праймеров, 5пкМ зонда. Условия проведения ПЦР: 5 мин 93°C, 50 циклов – 15 сек 93°C, 60 сек 55°C, 60 сек 72°C, далее 15 сек 25°C с использованием прибора CFX96 (Biorad).

Результаты и обсуждение. Сравнительный анализ жизнеспособности по ряду показателей выявил, что СИП у особей линии Биос-3, выращенных на среде с метотрексатом ниже, в 2 раза, чем в контрольной группе, а именно: в контрольной группе данный показатель $25,74 \pm 1,99$, при воздействии метотрексатом - $12,44 \pm 1,39$. Как и в случае с СИП, более высокие значения частоты гибели потомства (F1) отмечаются у особей линии Биос-3. В контрольной группе - $2,15 \pm 0,72$, а в группе, находящейся под воздействием метотрексата - $2,52 \pm 0,73$. Частота гибели потомства на стадии позднего эмбрионального развития в контрольной группе - $1,44 \pm 0,60$, а при воздействии метотрексата - $0,92 \pm 0,25$. Наибольшая частота повреждений типа «вырезка» на крыле наблюдается в течение всего отбора в линии Host F54, она достигает 80,7%. Морфометрический анализ использовался для обнаружения различий в линейных параметрах и площадях ячеек крыльев особей после воздействия

Таблица

Количество копий *hobo* и *hobo*-подобных элементов у исследованных генотипов линий дикого типа *Drosophila melanogaster* (Host, Белгород, Биос-3)

генотип	количество	генотип	количество	генотип	количество
Host контроль	165140 $\pm 2,49$	Белгород контроль	2431362 $\pm 1,42$	Биос-3 контроль	554182 $\pm 3,68$
Host P	2568 $\pm 3,43$	Белгород P	94629 $\pm 1,38$	Биос-3 P	441892 $\pm 1,38$
Host F ₆₀	536543 $\pm 1,67$	Белгород F ₇₂	6039 $\pm 3,73$	Биос-3 F ₇₅	9200835 $\pm 2,25$

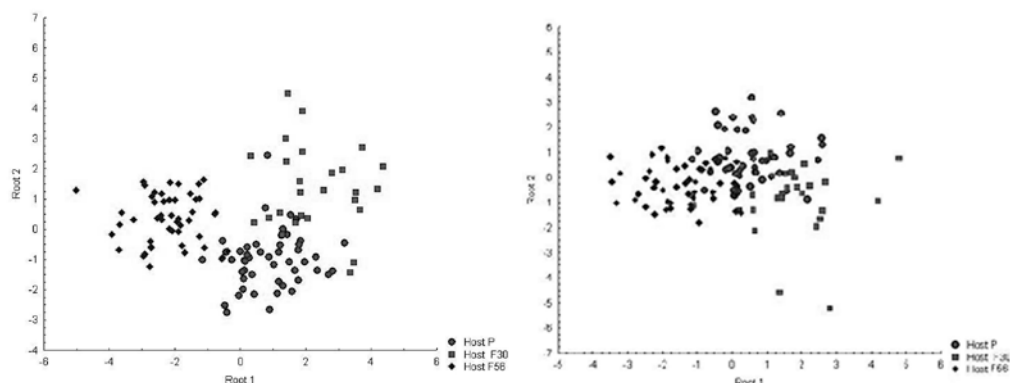


Рис.2. Графическое отображение дискриминантного анализа линейных(слева) и двумерных параметров(справа) крыла линии Биос-3, изменяющихся при длительной направленной селекции на метотрекстате относительно контрольной группы и родительского поколения (P), выращенном на метотрекстате.

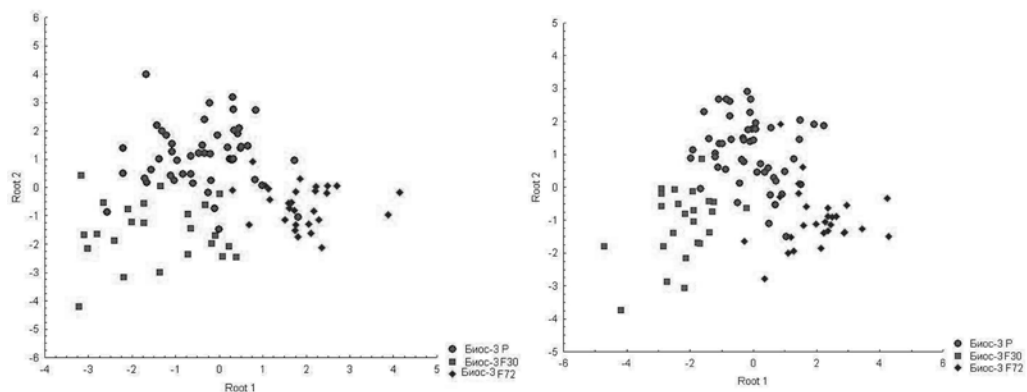


Рис.3. Графическое отображение дискриминантного анализа линейных(слева) и двумерных параметров(справа) крыла линии Host, изменяющихся при длительной направленной селекции на метотрекстате относительно контрольной группы и родительского поколения (P), выращенном на метотрекстате.

метотрекстатом дозой 400 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (для линий Биос-3 и Host LD_{50} , для линии Белгород LD_{70}), а также метотрекстатом на протяжении нескольких десятков поколений. У линии Белгород изменению не подвергаются такие значительные по размеру ячеи крыла как 25 и 26, составляющие практически 50% крыловой пластинки. Таким образом, с учетом различий таких линейных параметров как AM, KB и FC можно предположить, что изменению подлежат лишь параметры верхней части крыловой пластины.

Таким образом, на основании результатов, полученных в ходе дискриминантного анализа морфометрических показателей крыла можно говорить о том, что линия дикого типа Белгород отличается от линий дикого типа Биос-3 и Host в отношении уровня онтогенетической и генотипической адаптации при воздействии факторов химического стресса. Копийность hobo и hobo-подобных элементов после первичного воздействия метотрекстатом у всех трех линий дикого типа прослеживается некоторое уменьшение данного показателя, но впоследствии в ходе длительной направленной селекции линейные различия становятся более выраженными (табл.).

При влиянии внешних стрессовых факторов в первую очередь воздействию фактора стресса подвергаются именно генеративные клетки, вплоть до полной стерилизации особи [4]. Получен ряд данных свидетельствующих в пользу предположения о том, что соматические клетки также подвергнуты влиянию стресса, как и генеративные клетки [5]. Тератогенный эффект, наблюдаемый в данном исследовании, может повлечь изменение геномной стабильности [6]. Известно, также, что именно hobo-элемент наиболее распространен и активен в линиях дикого типа, отловленных в природе, что демонстрируется в ряде работ на линии Умань, наличие и активность hobo и P элементов в которой определяется с использованием как пцр, так и флюоресцентной гибридизации *in situ* [7]. Также в ряде других работ проведенных как на особях дикого типа, так и на мутантных лабораторных линиях показано активная роль транспозонов в формировании адаптации [8]. Линии Биос-3 и Host устойчивы к химическому воздействию, а линия Белгород демонстрирует противоположные свойства. Данные различия нивелирует длительный отбор, в ходе которого Биос-3 вновь становится чувстви-

тельной к метотрексату относительно остальных линий, а Белгород устойчивой. Данное предположение высказывается, основываясь на показателе частоты встречаемости повреждений типа «вырезка» на крыле, а также на дискриминантном анализе крыловых параметров. Результаты, полученные в ходе эксперимента, позволяют сделать, хотя и косвенный, вывод об активизации мобильных генетических элементов. Исключением может послужить лишь линия дикого типа Белгород, в ходе отбора у которой незначительно видоизменяется по соотношению параметров крыловая пластина, что, вероятно, свидетельствует о малой активизации мобильных генетических элементов, либо даже их дезактивизации. Молекулярно-генетический анализ копийности hobo-элемента подтвердил уменьшение количества hobo и hobo-подобных элементов в линии Белгород, что можно объяснить возможностью экс-

цизии транспозонов [9]. Последующая селекция привела к тому, что особи данной линии откладывали единичные яйца, не развивающиеся либо неоплодотворенные, что в последствие привело к гибели линии, достигшей 74 поколения отбора.

Заключение. Немаловажным является исходное количество копий hobo и hobo-подобных элементов, а также направление отбора. Направленный отбор в условиях стресса может привести к сильной активизации транспозонов, и соответственно к более высокой изменчивости особей внутри линии за счет большей геномной нестабильности. Дезактивизация же транспозонов благодаря механизмам эксцизии, либо за счет других механизмов приводит в свою очередь к очень низкой изменчивости, которая в условиях стресса может приводить к гибели особей.

Работа проведена при финансовой поддержке гранта РФФИ НК-14-04-31654.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Abazykin G., Kondrashov A.S. Major role of positive selection in the evolution of conservative segments of *Drosophila* proteins. *Proc.R.Soc.B*.2012; V.279: 3409-17.
2. Stampfer M.J., Christensen B., Grovannucci E. et al. A polymorphism of the methionine synthase gene: association with plasma folate, vitamin B12, homocyst(e)ine, and colorectal cancer risk. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 1999;V.8. (9): 825-29.
3. Martin F.A., Herrera S.C., Morata G. Cell competition, growth and size control in the *Drosophila* wing imaginal disc // *Development*. 2006; V.136. (22): 3747-56.
4. Kislukhin G., Murphy M.L., Jafari M., Long A.D. Chemotherapy - induced toxicity is highly heritable in *Drosophila melanogaster*. *Pharmacogenet. Genomics*. 2012; V. 22.(4): 285-89.
5. Коваленко Л.В., Захаренко Л.П., Захаров И.К. Транспозиция hobo-элемента в соматических клетках *Drosophila melanogaster*. *Генетика*. 2006; Т.42. (2): 177-84.
6. Антосюк О.Н., Марвин А.М., Марвин Н.А. Сравнительный анализ воздействия цитостатических препаратов на нестабильность генома *Drosophila melanogaster*. *Биомедицина*. 2014; (3): 83-91.
7. Захаренко Л.П., Воложина М.А., Захаров И.К. Влияние генетического окружения на лocus-специфичную нестабильность в гене yellow *Drosophila melanogaster* из Умани. *Генетика*. 2007; Т. 43. (7): 938-42.
8. Sheen F., Lim K., Simmons M.J. 1993. Genetic Instability in *Drosophila melanogaster* Mediated by hobo Transposable Elements. *Genetics*. 1993; V. 133: 315-34.
9. Atkinson P.W., Warren W.D., O`Brochta D.A. The hobo transposable element of *Drosophila* can be cross-mobilized in houseflies and excises like the Ac element of maize. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1993; V. 90.(20): 9693-97.

REFERENCES:

1. Abazykin G., Kondrashov A.S. Major role of positive selection in the evolution of conservative segments of *Drosophila* proteins. *Proc.R.Soc.B*.2012;V.279: 3409-17.
2. Stampfer M.J., Christensen B., Grovannucci E. et al. A polymorphism of the methionine synthase gene: association with plasma folate, vitamin B12, homocyst(e)ine, and colorectal cancer risk. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*1999;V.8. (9): 825-29.
3. Martin F.A., Herrera S.C., Morata G. Cell competition, growth and size control in the *Drosophila* wing imaginal disc. *Development*.2006; V.136. (22): 3747-56.
4. Kislukhin G., Murphy M.L., Jafari M., Long A.D. Chemotherapy - induced toxicity is highly heritable in *Drosophila melanogaster*. *Pharmacogenet. Genomics*.2012; V. 22.(4): 285-89.
5. Kovalenko L.V., Zaharenko L.P., Zaharov I.K. Transposition of the hobo element in *Drosophila melanogaster* somatic cells. *Genetika*. 2006; V.42. (2):177-84 (In Russian).
6. Antosyuk O.N., Marvin A.M., Marvin N.A. The comparative analysis of influence of cytostatic drugs on genome instability of *Drosophila*. *Biomedicine*. 2014; (3): 83-1 (In Russian).
7. Zakharenko L.P., Voloshina M.A., Zakharov I.K. The effect of genetic environment on locus-specific instability of the yellow gene in Uman' population of *Drosophila melanogaster*. *Genetika*. 2007; V.43 (7): 938-42 (In Russian).
8. Sheen F., Lim K., Simmons M.J. 1993. Genetic Instability in *Drosophila melanogaster* Mediated by hobo Transposable Elements. *Genetics*. 1993; V. 133: 315-34.
9. Atkinson P.W., Warren W.D., O`Brochta D.A. The hobo transposable element of *Drosophila* can be cross-mobilized in houseflies and excises like the Ac element of maize. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1993;V. 90.(20): 9693-97.

O.N. Antosyuk, A.M. Marvin

THE INVESTIGATION OF METHOTREXATE BIOLOGICAL EFFECTS ON EXAMPLE OF *Drosophila melanogaster*

Ural Federal University named after the first President of Russia B.N. Yeltsin
620002 Ekaterinburg, Russian Federation

Results of investigations into some immunobiochemical indices in crucian carp at a chronic exposure to sublethal concentrations of copper ions are reported. Anti-microbial properties in the blood serum and a share of immunodeficient fishes were studied; in liver a content of nonspecific immune complexes, level of common lipids, content of lipid peroxidation products and antioxidant activity were investigated. The dependency of values of indices under consideration on how long fishes stayed under experimental conditions was shown.

Keywords: fish, copper ions, humoral immunity, lipids, pro-and anti-oxidant system.

Материал поступил в редакцию 24.11.2014 г.