

© Ю.В.Саенко, А.М.Шутов, Р.Х.Мусина, 2006
УДК 616.61-02:615.099:615.33.577]-092.4

Ю.В. Саенко, А.М. Шутов, Р.Х. Мусина

К МЕХАНИЗМУ ТОКСИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ ДОКСОРУБИЦИНА НА ПОЧКИ

Yu. V. Saenko, A. M. Shutov, R. Kh. Musina

ON THE MECHANISM OF TOXIC EFFECT OF DOXORUBICIN ON THE KIDNEYS

Кафедра фармакологии с курсом клинической фармакологии, кафедра терапии и профессиональных болезней и кафедра лучевой диагностики, лучевой терапии и онкологии медицинского факультета Ульяновского государственного университета, Россия

РЕФЕРАТ

ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ. Механизмы токсического действия доксорубицина (ДОК) на почки остаются неясными, что послужило основанием для уточнения влияния ДОК на клетки с использованием в качестве клеточной эукариотической модели *Saccharomyces cerevisiae*. **МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ.** В исследовании использовался штамм *S. cerevisiae* YPH499. Инкубацию клеток с различными концентрациями доксорубицина проводили в течение 24 часов. Степень повреждения ДНК оценивали по активности гена рибонуклеотидредуктазы-3 (RNR3). Определяли концентрацию восстановленного глутатиона (ГSH), окисленного глутатиона (GSSG), содержание малонового диальдегида (МДА). **РЕЗУЛЬТАТЫ.** ДОК вызывал снижение клеточной пролиферации, приводил к росту концентрации ГSH, при этом отмечался достоверный рост концентрации GSSG, но выраженный в меньшей степени. В контрольных экспериментах отношение ГSH/GSSG было $7,33 \pm 0,28$, тогда как в экспериментах с 10, 20, 30, 40, 50 мкМ ДОК отношение ГSH/GSSG составляло $7,52 \pm 1,08$ ($p > 0,05$); $5,51 \pm 0,46$ ($p < 0,01$); $6,38 \pm 2,39$ ($p > 0,05$); $5,19 \pm 0,63$ ($p < 0,01$) и $5,05 \pm 0,70$ ($p < 0,01$), соответственно. ДОК вызывал увеличение экспрессии гена *RNR3*. Содержание малонового диальдегида существенно не изменялось. **ЗАКЛЮЧЕНИЕ.** При инкубации *S. cerevisiae* в среде, содержащей ДОК и глюкозу, увеличение ГSH, обусловленное экспрессией гена *RNR3*, компенсирует избыточное образование свободных радикалов и не ведет к свободно-радикальному повреждению биомолекул. В почках животных при введении ДОК не обеспечивается достаточной концентрации ГSH, и в этих условиях свободные радикалы индуцируют оксидативный стресс за счет редокс циклических реакций ДОК.

Ключевые слова: глутатион, доксорубин, оксидативный стресс, рибонуклеотидредуктаза, *Saccharomyces cerevisiae*.

ABSTRACT

THE AIM of the investigation was to specify effects of doxorubicin (DOX) on renal cells using eukaryotic model *Saccharomyces cerevisiae* since the mechanisms of toxic effects of DOX on the kidneys still remain obscure. **MATERIALS AND METHODS.** The investigation was performed with strain *S. cerevisiae* YPH499. Incubation of the cells with different concentrations of DOX lasted 24 hours. The degree of injury of DNA was evaluated by activity of the ribonucleotide reductase -3 (RNR3). The concentration of reduced glutathione (G-SH), oxidized glutathione (G-SSG), contents of malonic dialdehyde (MDA) were determined. **RESULTS.** DOX caused a decrease of cell proliferation, resulted in growing concentration of G-SH and so a reliable growth of the concentration of G-SSG was noted, but in less degree. In control experiments the ratio G-SH/G-SSG was 7.33 ± 0.28 while in experiments with 10, 20, 30, 40, 50 мкМ DOX the ratio G-SH/G-SSG was 7.52 ± 1.08 ($p > 0.05$); 5.51 ± 0.46 ($p < 0.01$); 6.38 ± 2.39 ($p > 0.05$); 5.19 ± 0.63 ($p < 0.01$) and 5.05 ± 0.70 ($p < 0.01$) respectively. DOX induced expression of gene *RNR3*. The content of malonic dialdehyde did not substantially change. **CONCLUSION.** During the incubation of *S. cerevisiae* in the medium containing DOX and glucose an increase of G-SH due to expression of gene *RNR3* compensates the redundant formation of free radicals and does not lead to free-radical damage of biomolecules. In the kidneys of animals administration of DOX fails to provide a sufficient concentration of G-SH and under these conditions free radicals induce oxidative stress at the expense of redox of cyclic reactions of DOX.

Key words: glutathione, doxorubicin, oxidative stress, ribonucleotide reductase, *Saccharomyces cerevisiae*.

ВВЕДЕНИЕ

Механизмы действия антрациклиновых антибиотиков на почки остаются неясными [1]. Ранее нами было показано, что в ответ на введение крысам доксорубицина (адриамицин) происходит снижение концентрации восстановленного глутатиона (ГSH) в почках крыс [2]. Это может свидетельствовать, что токсическое действие доксорубицина (ДОК) на почки обусловлено индукцией оксидативного стресса. Однако снижение concentra-

ции ГSH может быть также следствием внутриклеточных метаболических нарушений [3]. Более того, в литературе имеются данные, свидетельствующие, что ДОК может вызывать увеличение внутриклеточного содержания ГSH [4].

Среди возможных механизмов токсического действия ДОК на клетки обсуждается ДНК-повреждающее действие [5]. В результате повреждения ДНК запускается каскад событий, связанный с активацией внутриклеточных сигнальных и

метаболических путей, в том числе активируется ген рибонуклеотидредуктазы-3 (RNR3), активность которого коррелирует с концентрацией GSH, что также косвенно свидетельствует о возможности влияния ДОК на внутриклеточную концентрацию GSH [6,7].

Удобной моделью для изучения внутриклеточных сигнальных механизмов являются одноклеточные эукариотические организмы – *Saccharomyces cerevisiae* [8]. Это связано с тем, что многие внутриклеточные метаболические, генетические и сигнальные механизмы в общих чертах схожи у большинства эукариотических клеток различных видов. *S. cerevisiae* уже успешно использовались с целью изучения токсических эффектов лекарственных средств, в том числе и антрациклиновых антибиотиков [9].

Целью исследования явилось уточнение влияния ДОК на клетки с использованием в качестве клеточной эукариотической модели *Saccharomyces cerevisiae*.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

В исследовании использовался штамм YPH499 (*MAT α* , *ura3-52*, *lys2-801*, *ade2-101*, *trp1-delta63*, *his3-delta200*, *leu2-delta1*). Плазмиду pZZ2 (*YCp*, *URA3*, *RNR3-LacZ*) мы получили от д-ра С. Эледжа (Центр геномики и протеомики, Гарвардская школа медицины, Бостон, США) [6].

Инкубацию клеток с различными концентрациями доксорубина проводили в течение 24 часов при температуре 25°С в минимальной синтетической среде без урацила. Проводилось 5 опытов с одной и той же концентрацией ДОК. Инкубация осуществлялась в круглодонных колбах объемом 250 мл, объем среды – 30 мл, на качалке (250 об/мин). Для определения степени клеточной пролиферации определялась оптическая плотность клеток при 600 нм (OD_{600}) [10].

Начальная концентрация клеток во всех опытах была одинаковой и составляла $OD_{600} = 0,3$. Трансформацию клеток осуществляли с использованием ацетата лития по методу Р. Гейтца [11].

Для оценки степени повреждения ДНК использовали показатель экспрессии гена рибонуклеотидредуктазы-3 (RNR3), который кодирует большую субъединицу фермента рибонуклеотидредуктазы [6]. Степень генотоксического эффекта доксорубина мы оценивали с помощью генетической конструкции *RNR3-LacZ*, которая была включена в низкокопийную плазмиду pZZ2. В генетической конструкции *RNR3-LacZ* промотор гена рибонуклеотидредуктазы 3 сцеплен с ферментом бета-галактозидазы. Это дает возможность по величине

не активности β -галактозидазы судить о степени экспрессии гена рибонуклеотидредуктазы 3 [12].

Определение активности β -галактозидазы проводилось с использованием *o*-нитрофенилгалактопиранозид в качестве субстрата и выражалась в единицах Миллера [13].

Концентрация GSH и GSSG определялась по методу Баккера [14]. Количество GSH и GSSG выражали в (мМ х мл)/(10^7 клеток). Для этого перед лизисом клеток определялась их оптическая плотность при 600 нм. При оптической плотности $OD_{600} = 1,0$ ($L = 1,0$) количество клеток принималось равным 1×10^7 [10].

Результаты обработаны статистически с использованием критерия Стьюдента для парных переменных. Показатели представлены как $M \pm SD$. Различия между сериями экспериментов считали достоверными при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

На рис. 1 представлена выраженность клеточной пролиферации при разных концентрациях доксорубина. Как видно из графика, доксорубин вызывал замедление клеточной пролиферации *S. cerevisiae* при концентрациях от 10 до 50 мкмоль.

Содержание GSH и GSSG при различных концентрациях доксорубина представлено на рис. 2. Доксорубин вызывал увеличение концентрации GSH, при этом одновременно с ростом концентрации GSH отмечался достоверный рост концентрации GSSG, но выраженный в меньшей степени. Отношение GSH/GSSG с ростом концентрации доксорубина снижалось. Так, в контрольных экспериментах этот показатель составлял $7,33 \pm 0,28$, тогда как в экспериментах с 10, 20, 30, 40, 50 мкМ ДОК отношение

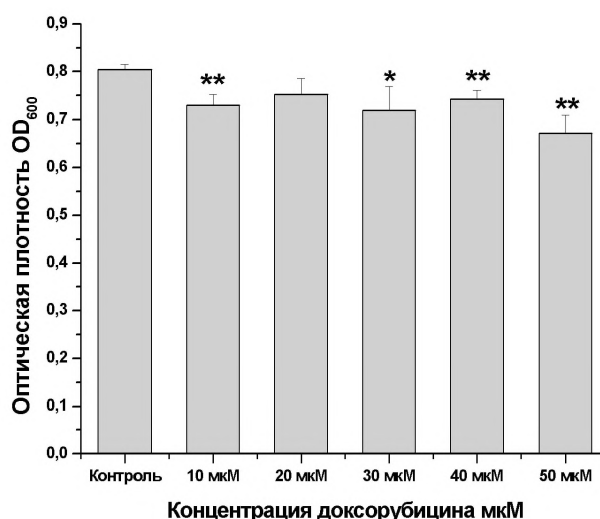


Рис. 1. Пролиферация клеток *S. Cerevisiae*, инкубированных в среде с разной концентрацией доксорубина. Примечание: * – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$.

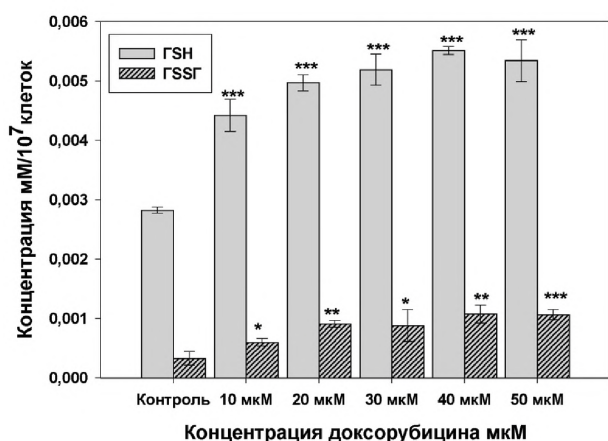


Рис. 2. Содержание GSH и GSSG в клетках *S. Cerevisiae*, инкубированных в среде с разной концентрацией доксорубина. Примечание: * – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$; *** – $p < 0,001$.

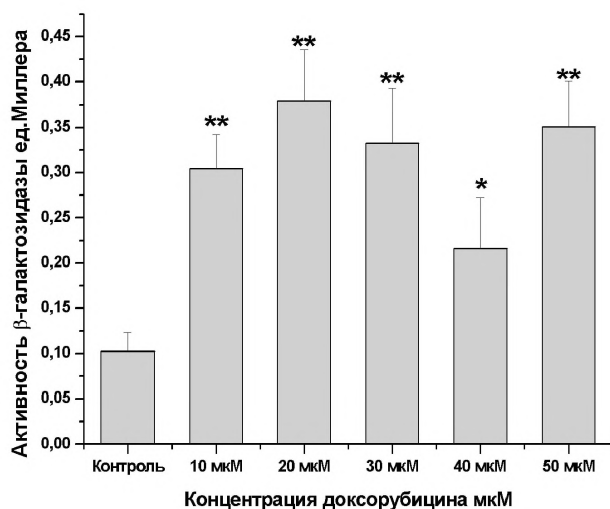


Рис. 3. Активность б-галактозидазы в клетках *S. Cerevisiae*, инкубированных в среде с разной концентрацией доксорубина. Примечание: * – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$.

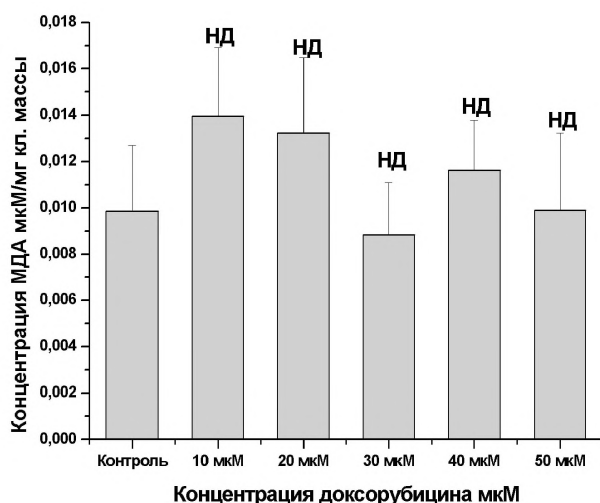


Рис. 4. Концентрация малонового диальдегида в клетках *S. Cerevisiae*, инкубированных в среде с разной концентрацией доксорубина. Примечание: НД – различие недостоверно.

GSH/TSSG составляло $7,52 \pm 1,08$ ($p > 0,05$); $5,51 \pm 0,46$ ($p < 0,01$); $6,38 \pm 2,39$ ($p > 0,05$); $5,19 \pm 0,63$ ($p < 0,01$) и $5,05 \pm 0,70$ ($p < 0,01$), соответственно.

Наибольшая активность β-галактозидазы и, соответственно, наибольшая экспрессия гена рибонуклеотидредуктазы-3 наблюдалась при концентрации доксорубина в ростовой среде равной 20 мкМ, а минимальная активность при концентрации доксорубина 40 мкМ (рис. 3).

Содержание малонового диальдегида при инкубации клеток в среде, содержащей ДОК, не отличалось от контроля (рис. 4).

ОБСУЖДЕНИЕ

Представленные данные свидетельствуют, что ДОК вызывает увеличение внутриклеточного содержания GSH у *S. cerevisiae*. Сам по себе факт роста концентрации GSH в ответ на добавление в ростовую среду доксорубина не является необычным и уже отмечался в экспериментах на культурах эукариотических клеток [4]. 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 крысам доксорубина происходит снижение концентрации GSH в почках [2].

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. В то же время клетки почек экспериментальных животных могли испытывать дефицит в глюкозе.

Глутатион восстановленный – низкомолекулярный содержащий серу трипептид, который может легко окисляться и быстро восстанавливаться, в этой связи он участвует во многих биохимических и фармакологических реакциях, регулирует экспрессию генов и апоптоз [15]. Показано, что отсутствие адаптивного адекватного увеличения GSH способствует большему повреждающему действию свободных радикалов [16]. Свободные радикалы могут вести к апоптозу, в частности, это показано при гентамициновой нефротоксичности [17]. При остром пуромициновом нефрозе окислительный стресс ведет к развитию апоптоза, что коррелирует с уровнем протеинурии у Sprague-Dawley крыс [18].

Следует отметить значение полиморфизма генов, ответственных за реакцию организма на оксидативный стресс [15]. Кроме того, разные ткани одного и того же организма по-разному отвечают на введение ДОК [19,20]. Большую подверженность сердца токсическому действию ДОК объясняют низкой активностью антиоксидантных ферментов, в отличие от тканей печени и почек [21].

Доксорубин способен принимать электрон и восстанавливаться до семихинона [22]. 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). Такие свойства доксорубина делают возможным повреждение ДНК либо непосредственно свободными радикалами, либо их продуктами.

Полученные нами данные свидетельствуют, что экспрессия RNR3 достигала максимума при 20 мкмоль, при дальнейшем росте концентрации доксорубина степень экспрессии RNR3 несколько снижалась.

Интересно, что легкая острая гентамициновая нефротоксичность предохраняет почки от хронических структурных изменений у крыс с односторонней нефрэктомией и адриамициновым нефрозом [17]. Механизм протективного действия низких доз гентамицина не ясен, однако аминокгликозиды в низких дозах при кратковременном применении могут увеличивать клеточную пролиферацию [23].

Увеличение экспрессии RNR3 происходило на фоне повышения концентрации ГSH. Фермент рибонуклеотид редуктаза восстанавливает рибозу до дезоксирибозы, используя при этом в качестве доноров водорода глутаредоксин и тиоредоксин. Глутаредоксин, окисляясь в реакции восстановления рибонуклеотидов, сам восстанавливается за счет окисления глутатиона [24].

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 двух молекул НАДФ⁺ до НАДФН₂, что также может вызвать увеличение концентрации ГSH [25]. Таким образом, увеличение экспрессии гена рибонуклеотид редуктазы сопровождается синтезом дополнительного количества ГSH.

Несмотря на рост содержания ГSH в ответ на увеличение концентрации доксорубина, отношение ГSH/ГSSГ уменьшалось, что свидетельствует о снижении окислительно-восстановительного

потенциала [26]. Такой эффект является следствием редокс-циклической активности ДОК.

Таким образом, доксорубин вызывает рост внутриклеточной концентрации ГSH в клетках *S. Cerevisiae*, что опосредуется через экспрессию гена RNR3. Одновременно с этим наблюдается рост концентрации ГSSГ, как результат редокс-циклической активности ДОК. Отмеченное в предыдущих наших работах снижение ГSH в почках крыс в ответ на введение ДОК может быть связано с недостаточной обеспеченностью клеток почек глюкозой, в результате чего инициируемое ДОК повышение концентрации ГSH через активацию экспрессии гена RNR3 не может реализоваться, тогда как редокс-циклическая активность доксорубина не снижается.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

При инкубации *S. cerevisiae* в среде, содержащей ДОК и глюкозу, увеличение ГSH компенсирует избыточное образование свободных радикалов и не ведет к свободно-радикальному повреждению биомолекул. В почках животных при введении ДОК не обеспечивается достаточной концентрации ГSH и в этих условиях наблюдается избыток свободных радикалов за счет редокс циклических реакций ДОК. Одной из возможных причин дефицита ГSH в клетках почек животных при введении ДОК является дефицит или недостаточное поступление глюкозы в клетки. Представленные данные открывают перспективу новых подходов к профилактике токсического действия ДОК на почки.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Gewirts DA. A critical evaluation of the mechanisms of action proposed for the antitumor effects of the anthracycline antibiotics adriamycin and daunorubicin. *Biochem Pharmacol* 1999;57:727-741
2. Саенко ЮВ, Шутов АМ, Напалкова СМ, Селиванова ОС. Эритропоэтин снижает проявления оксидативного стресса, индуцированного доксорубином, в почках крыс. *Нефрология* 2005;9(2):96-100
3. Lu SC. Regulation of hepatic glutathione synthesis: current concepts and controversies. *FASEB J* 1999;13:1169-1183
4. Pinkus R, Weiner LM, Daniel V. Role of quinine-mediated generation of hydroxyl radicals in the induction of glutathione S-transferase gene expression. *Biochemistry* 1995;34: 81-88
5. Doroshow JH, Synold TW, Somlo G et al. Oxidative DNA base modifications in peripheral blood mononuclear cells of patients treated with high-dose infusion doxorubicin. *Blood* 2001;97:2839-2845
6. Elledge SJ, Davis RW. Two genes differentially regulated in the cell cycle and by DNA-damaging agents encode alternative regulatory subunits of ribonucleotide reductase. *Genes Dev* 1990;4:740-751
7. Miranda-Vizuete A, Rodri'guez-Ariza A, Toribio F, et al. The levels of ribonucleotide reductase, thioredoxin, glutaredoxin 1, and GSH are balanced in *Escherichia coli* K12. *J Biol Chem* 1996;271(32):19099-19103
8. Goffeau A, Barrell BG, Bussey B et al. Life with 6000 genes. *Science* 1996;274: 546-567
9. Buschini A, Poli P, Rossi C. *Saccharomyces cerevisiae*

as an eukaryotic cell model to assess cytotoxicity and genotoxicity of three anticancer anthraquinones. *Mutagenesis* 2003;18:26-36

10. Berlin V, Brill JA, Trueheart J et al. Genetic screens and selections for cell and nuclear fusion mutants. *Methods in Enzymology* 1991;194:774-792

11. Gietz RD, Woods RA. Transformation of yeast by lithium acetate/single-stranded carrier DNA/polyethylene glycol method. *Methods in Enzymology* 2002;350: 87-96

12. Jia X, Xiao W. Compromised DNA repair enhances sensitivity of the yeast *RNR3-LacZ* genotoxicity testing system. *Toxicological Science* 2003;75:82-88

13. Guarente L. Yeast promoters and *lacZ* fusions designed to study expression of cloned genes in yeast. *Methods Enzymol* 1983;101:181-191

14. Baker MA, Cerniglia GJ, Zaman A. Microtiter plate assay for the measurement of glutathione and glutathione disulfide in large numbers of biological samples. *Anal Biochem* 1990;190:360-365

15. Jefferies H, Coster J, Khalil A et al. Glutathione ANZ. *J Surg* 2003;73:517-522

16. Kannan K, Jain SK. Oxidative stress and apoptosis. *Pathophysiology* 2000;7:153-163

17. Martinez-Salvado C, Eleno N, Morales AI et al. Gentamicin treatment induced simultaneous mesangial proliferation and apoptosis in rats. *Kidney Int* 2004;65:2161-2171

18. Rincon J, Romero M, Viera N et al. Increased oxidative

stress and apoptosis in acute puromycin aminonucleoside nephrosis. *Int J Exp Path* 2004;85:25-33

19. Liu QY, Tan BK. Relationship between anti-oxidant activities and doxorubicin-induced lipid peroxidation in P388 tumour cells and heart and liver and mice. *Clinical and experimental pharmacology and Physiology* 2003;30:185-188

20. Liu QY, Tan BK. Dietary fish oil and vitamin E enhance doxorubicin effects in P388 tumor-bearing mice. *Lipids* 2002;37:549-556

21. Doroshow JH, Locker GY, Myers CE. Enzymatic defenses of the mouse heart against reactive oxygen metabolites: Alterations produced by doxorubicin. *J Clin Invest* 1980;65:128-135

22. Powis G. Free radical formation by antitumor quinones. *Free Rad Biol Med* 1989;6:63-101

23. Toubreau G, Laurent G, Carlier MB et al. Tissue repair in rat kidney cortex after short treatment with aminoglycosides at low doses. *Lab invest* 1986;54:385-393

24. Arner ESJ, Holmgren A. Physiological functions of thioredoxin and thioredoxin reductase. *Eur J Biochem* 2000; 267:6102-6109

25. Schafer QF, Buettner GR. Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple. *Free Rad Biol Med* 2001;30: 1191-1212

26. Klatt P, Lamas S. Regulation of protein function by S-glutathiolation in response to oxidative stress. *Eur J Biochem* 2000;267:4928-4944

Поступила в редакцию 14.06.2006 г.