

УВЕЛИЧЕНИЕ ЭФФЕКТИВНОСТИ ПОСТРЕПЛИКАТИВНОЙ РЕПАРАЦИИ ПРЕДМУТАЦИОННЫХ ИНТЕРМЕДИАТОВ ДНК В КЛЕТКАХ ДРОЖЖЕЙ *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИМ ПРЕПАРАТОМ «ГЕПТРОНГ»

*В работе приведены материалы исследований генотоксичности фармацевтического препарата «Гептронг». Полученные результаты свидетельствовали, что препарат повышает эффективность пострепликативной репарации предмутационных ДНК в клетках дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*. Этот препарат может иметь практическое значение в химической и радиационной терапии.*

Ключевые слова: генные мутации, репарация, мутагенез.

*У роботі наведено матеріали дослідження генотоксичності фармацевтичного препарату «Гептронг». Отримані результати свідчили, що препарат підвищує ефективність постреплікативної репарації предмутаційних ДНК у клітинах дріжджів *Saccharomyces cerevisiae*. Цей препарат може мати практичне значення у хімічній і радіаційній терапії.*

Ключові слова: генні мутації, репарація, мутагенез.

*Materials of genotoxicity researches of pharmaceutical preparation «Geptrong» are in-process resulted. Got results testified preparation is promoted by efficiency of postreplikational reparation of before-mutational DNA in the cages of *Saccharomyces cerevisiae* yeasts. This preparation can have a practical value in chemical and radiation therapy.*

Key words: gene mutations, reparation, mutagenез.

Для предотвращения канцерогенеза и других болезней, вызываемых мутациями ДНК, важно не только избегать факторов риска, но и использовать защитные вещества, снижающие мутагенез или активирующие защитные механизмы клетки. В настоящее время описано много веществ, обладающих антимуtagenным и антиканцерогенным действием. Антимуtagenны могут быть подразделены на две группы: десмутагены и биоантимуtagenны. Первые вызывают химическую или биохимическую модификацию мутагенов перед тем, как они воздействуют на ДНК клетки. Группа десмутагенов включает редуцирующие агенты, широко распространенные антиоксиданты, ингибиторы транскрипционных факторов и др. К биоантимуtagenнам относятся вещества, влияющие на процессы репарации и репликации ДНК в клетках, подвергнутых воздействию мутагенов.

При изучении генотоксичности нового фармакологического препарата гептронг мы обнаружили, что он не только не увеличивал выход прямых генных мутаций, но заметно

снижал их уровень. В коротком тесте мы использовали штамм 2-LMG-3031, высокочувствительный к мутагенному действию различных генотоксикантов, что определяется наличием в клетках этого штамма мутаций *rad2* и *hsm3*. Обработка гептронгом клеток штамма 2-LMG-3031 в течение 24 часов привела к снижению частоты спонтанных мутаций в генах *ADE4- ADE8* от $(9,5 \pm 1,5) \times 10^{-6}$ в контроле до $(5,5 \pm 2,4) \times 10^{-6}$. За это время гептронг не оказывал влияния на размножение клеток.

Для более точной оценки влияния гептронга на частоту спонтанных мутаций были использованы методы упорядоченного посева и флуктуационный тест медиан. Данные этих исследований представлены в табл. 1. Ранее мы показали, что метод упорядоченного посева позволяет предпочтительно измерять частоту спонтанных мутаций, возникающих в результате ошибок в работе репарационных систем. В этих экспериментах мы использовали штаммы 2-LMG-3031 и IVF-317, характеризующиеся повышенной частотой спонтанных мутаций

канаванинустойчивости. Ге́птронг снижал частоту спонтанных мутаций в *ADE4* – *ADE8* локусах у штамма 2-LMG-3031 в десять раз, частота мутаций канаванинустойчивости у штамма IVF-317 снижалась в два раза под действием ге́птронга.

Метод медиан в основном регистрирует частоту спонтанных мутаций, появляющихся в результате ошибок репликации ДНК. Как следует из табл. 1, во флуктуационном тесте медиан у штамма IVF-317 мы не наблюдали различий в частоте спонтанных мутаций канаванинустойчивости в контроле и в опыте. Таким образом, у разных штаммов при учете разных типов спонтанных мутаций, на разных средах ге́птронг понижает спонтанный мутагенез, обусловленный ошибками репарации, но не изменяет спонтанный мутагенез, вызванный ошибками репликации.

При изучении влияния ге́птронга на частоту индуцированных мутаций были определены условия, в которых проявляется максимальное действие ге́птронга. Ге́птронг наносили на поверхность питательной среды, на которую высевали обработанные мутагеном клетки. Оптимальная концентрация ге́птронга была определена при изучении его действия на уровень мутагенеза в *ADE4*-*ADE8* локусах на штамме 2-LMG-3031 при облучении его УФ-лучами в дозе 6 Дж/м². В контроле без ге́птронга использованная доза УФ-лучей повышала частоту мутаций до уровня $(120,6 \pm 20,9) \times 10^{-4}$. Концентрация ге́птронга 5 мл/л понижала этот уровень до $(69,0 \pm 11,7) \times 10^{-4}$; 0,5 мл/л – до $(64,4 \pm 8,3) \times 10^{-4}$, а 0,05 мл/л – до $(109,1 \pm 8,8) \times 10^{-4}$. Во всех дальнейших экспериментах по изучению спонтанного и индуцированного мутагенеза использовали среду, концентрация ге́птронга в которой составляла 0,5 мл/л.

Мы испытали натуральный мед на возможность антиму́тагенного влияния. По методу, описанному выше, проверили действие нескольких концентраций меда на УФ-индуцированный мутагенез у штамма 2-LMG-3031. Антиму́тагенный эффект в этих экспериментах не был обнаружен.

Состав среды не влиял на антиму́тагенный эффект ге́птронга. Так частота УФ-индуцированных мутаций в *ADE1* и *ADE2* локусах у штамма 7-PG-301 учитывалась на среде полного состава с ге́птронгом. В этих экспериментах УФ-облучение в дозах 84 Дж/м² и 126 Дж/м² вызывало появление мутаций с частотой $(4,4 \pm 1,2) \times 10^{-4}$ и $(8,4 \pm 2,1) \times 10^{-4}$ на среде без ге́птронга и на среде с ге́птронгом – $(3,2 \pm 0,8) \times 10^{-4}$ и $(4,4 \pm 0,3) \times 10^{-4}$ соответственно.

Три хорошо изученных мутагена: УФ- и гамма-лучи и химический супермутаген ЭМС, вызывающие различные первичные повреждения ДНК, были использованы, чтобы выяснить, распространяется ли антиму́тагенное действие ге́птронга на летальные и мутагенные повреждения, индуцированные этими агентами. Данные рис. 1 показывают, что ге́птронг практически не изменял выживаемость клеток и понижал частоту мутаций в *ADE4*-*ADE8* локусах у тестерного штамма

2-LMG-3031: При УФ-облучении – в два раза, гамма-облучении – в три раза и ЭМС – в полтора раза.

Влияние ге́птронга на частоту мутаций у дефектных по репарации мутантов. Однонаправленное действие ге́птронга на снижение частоты мутаций, индуцированных различными мутагенами, и различное влияние его на репликативный и репарационный мутагенез позволяет предположить, что генетический эффект ге́птронга может зависеть от генов, контролирующих системы репарации у дрожжей. Для выявления репарационной системы, на которую влияет ге́птронг, были использованы штаммы дрожжей, несущие мутации, блокирующие разные системы репарации. Во всех экспериментах учитывали частоту УФ-индуцированных мутаций аденинзависимости в *ADE4*-*ADE8* локусах. Данные рис. 2 показывают, что ге́птронг понижает частоту мутаций как в клетках штамма дикого типа, так и у *rad 2* мутанта с заблокированной нуклеотидной эксцизионной репарацией. При максимальной дозе УФ-облучения снижало выживаемость клеток до 10 %, при этом ге́птронг не оказывал заметного влияния на выживаемость. Следовательно, блокирование нуклеотидной эксцизионной репарации не влияет на антиму́тагенный эффект ге́птронга.

Гены *RAD51*, *RAD54* и *RAD59* контролируют различные стадии рекомбинационного процесса. Ген *RAD51* контролирует раннюю стадию гомологичной рекомбинации – формирование D-петли, необходимое как для рекомбинационной репарации, так и для безошибочной ветви пострепликативной репарации. Продукт гена *RAD54* участвует в процессе гомологичной рекомбинации на более поздних этапах. Ген *RAD59* контролирует ветвь рекомбинационной репарации параллельную *RAD51*-зависимой ветви. Влияние ге́птронга на мутагенез было изучено на 3-х мутантных штаммах дефектных по рекомбинационной репарации: *rad51*, *rad54* и *rad59* (рис. 3). Ге́птронг значительно понижал частоту мутаций у *rad54* и *rad59* мутантов, но не влиял на частоту мутаций у *rad51* мутанта. Чтобы исключить влияние различий в генотипах *rad51* мутантов, являющихся сегрегантами гибридов, на обработку ге́птронгом нами было проверено несколько таких сегрегантов. Все проверенные сегреганты не отличались по реакции на ге́птронг. Следовательно, данные рис. 3 свидетельствуют об отсутствии влияния ге́птронга на уровень мутагенеза у штаммов, несущих мутацию *rad51*. Таким образом, полученные в этом разделе данные не позволяют сделать однозначный вывод о влиянии ге́птронга на рекомбинационный путь репарации поврежденных ДНК. Для решения этого вопроса мы оценили влияние ге́птронга на индуцированную УФ-лучами митотическую рекомбинацию в прямых экспериментах. Диплоид ПГ-155 позволяет учитывать частоту митотической сегрегации и кроссинговера между геном *ADE2* и центромерой. Результаты экспериментов по изучению влияния ге́птронга на рекомбинационные процессы представлены на рис. 4. Из этого рисунка видно, что ге́птронг не изменяет частоты УФ-индуци-

рванной митотической сегрегации и митотического кроссинговера и не влияет на выживаемость диплоидных клеток.

Приведенные выше результаты позволяют предположить, что гептронг влияет на безошибочную рекомбинационную ветвь пострепликативной репарации. Ранее мы показали, что ген *HSM3*, контролирует репарацию ошибочно спаренных оснований, возникающих в процессе пострепликативной репарации УФ-повреждений ДНК. При этом *HSM3* эффективно конкурирует с генами, контролирующими мисматчрепарацию *PMS1* и *MSH2*, роль которых в УФ-индуцированном мутагенезе в штаммах дикого типа практически, не выявляется, но в мутантах *hsm3* она заметна. На Рис. 5 приведены данные о влиянии гептронга на УФ-индуцированный мутагенез у мутантов,

дефектных по коррекции ошибочно спаренных оснований *hsm3*, *pms1* и *msh2*. Гептронг значительно снижал уровень мутагенеза у мутанта *hsm3*. Следовательно, гептронг не влияет на эту ветвь репарационного процесса. В то же время гептронг не изменял частоту УФ-индуцированных мутаций у мутантов *pms1* и *msh2*. Таким образом, этапы репарации, блокируемые мутациями *rad51*, *pms1*, *msh2*, необходимы для антимутагенного действия гептронга. Известно, что гены, контролирующие репарацию ошибочно спаренных оснований, являются гомологичными у дрожжей и человека. В этой связи гептронг имеет практическое значение в химической и радиационной терапии, снижая уровень нежелательного мутагенеза, индуцируемого этими факторами.

Таблица 1

Влияние гептронга на спонтанный мутагенез

Штамм	Тестируемая мутация	Обработка	Частота спонтанных мутаций	
			Упорядоченный посев	Флуктуационный метод
2-LMG-3031 (<i>rad2 hsm3</i>)	<i>ADE4-ADE8</i>	Контроль	$(5,4 \pm 1,2) \times 10^{-6}$	
		Гептронг	$(0,4 \pm 0,1) \times 10^{-6}$	
IVF-317 (<i>pol3 hsm3</i>)	<i>CAN^S → CAN^R</i>	Контроль	$(4,2 \pm 0,2) \times 10^{-6}$	$(8,8 \pm 1,3) \times 10^{-7}$
		Гептронг	$(2,1 \pm 0,2) \times 10^{-6}$	$(7,4 \pm 2,3) \times 10^{-7}$

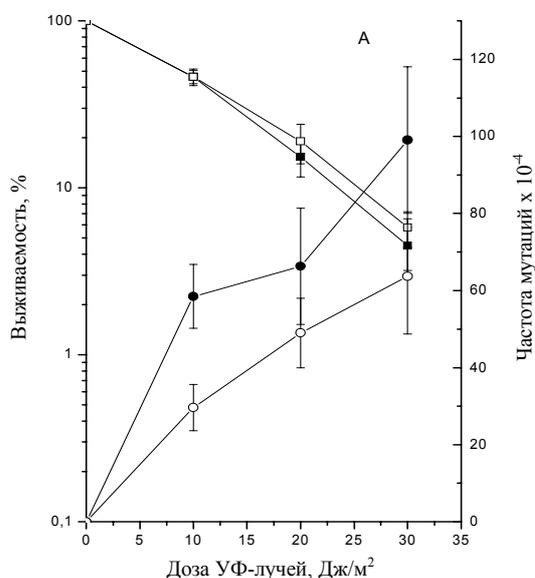


Рис. 1. Влияние гептронга на выживаемость и частоту мутаций, индуцированных УФ-лучами (А), гамма-лучами (Б) и ЭМС (В) в *ADE4-ADE8* локусах штамма 2-LMG-3031 (*rad2 hsm3*).

Выживаемость (■, □) и мутагенез (●, ○); закрашенные символы – без гептронга, светлые символы – с гептронгом

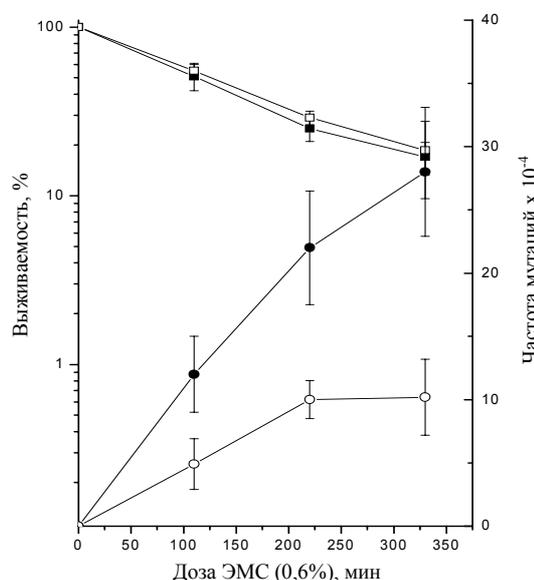


Рис. 2. Влияние гептронга на частоту мутаций в *ADE4-ADE8* локусах штаммов 11-D3031 (дикий тип) ●, ○ и LMG-318 (*rad2*) ■, □. Закрашенные символы – без гептронга, светлые символы – с гептронгом

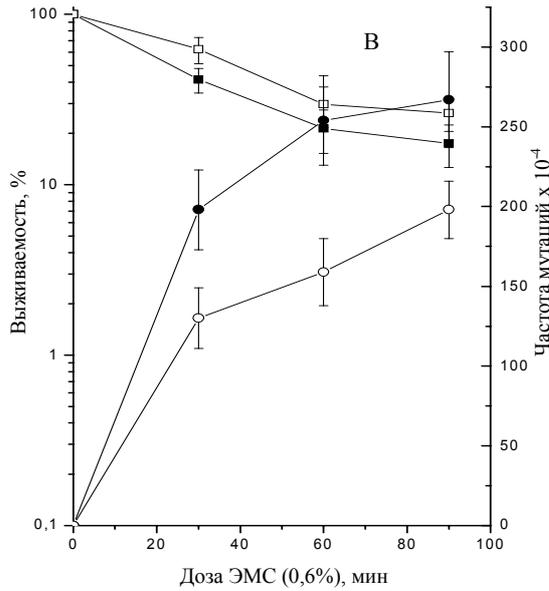


Рис. 3. Влияние гептронга на частоту мутаций в *ADE4-ADE8* локусах штаммов 4-SVK-3033 (*rad51*) ●, ○; LMG-355 (*rad54*) ▲, △ и 8-SVK-3034 (*rad59*) ■, □. Закрашенные символы – без гептронга, светлые символы – с гептронгом

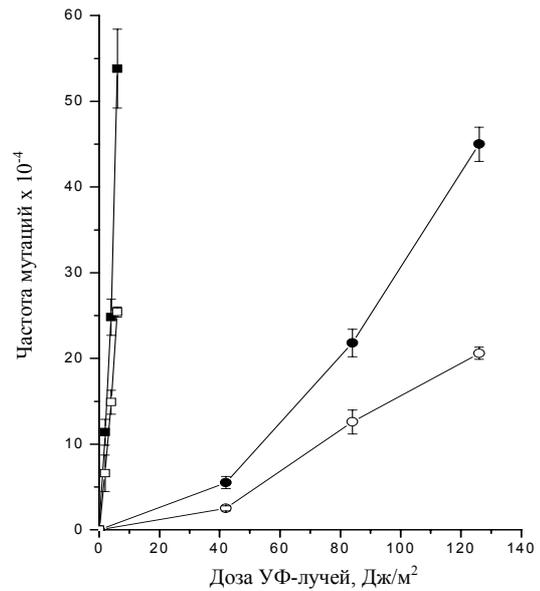


Рис. 4. Влияние гептронга на выживаемость и частоту митотической рекомбинации, индуцированной УФ-лучами в штамме PG-155. Выживаемость (■, □); сегрегация (●, ○); кроссинговер (▲, △)

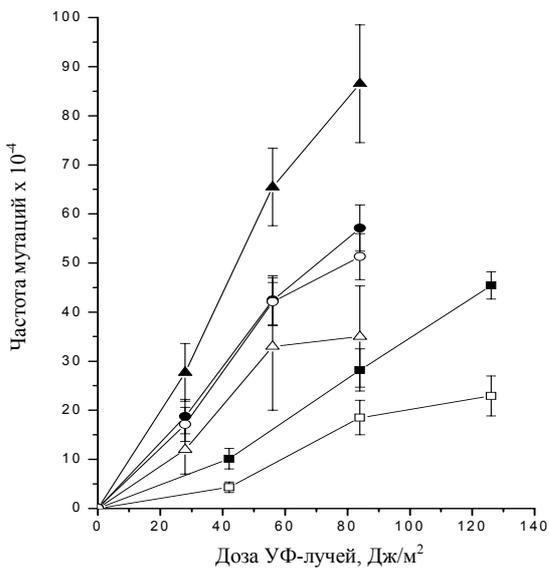
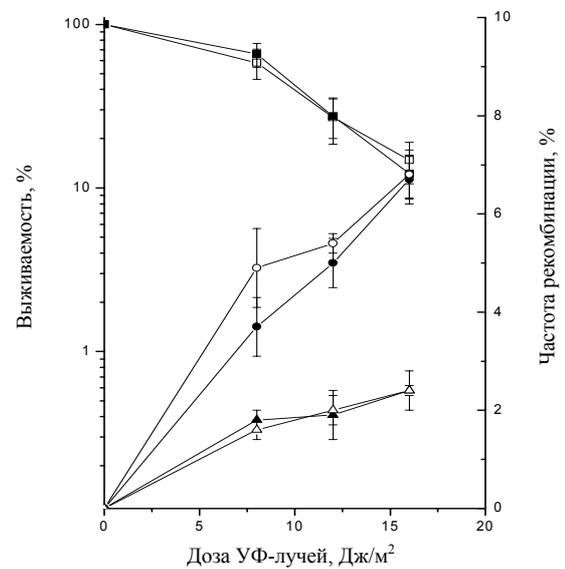
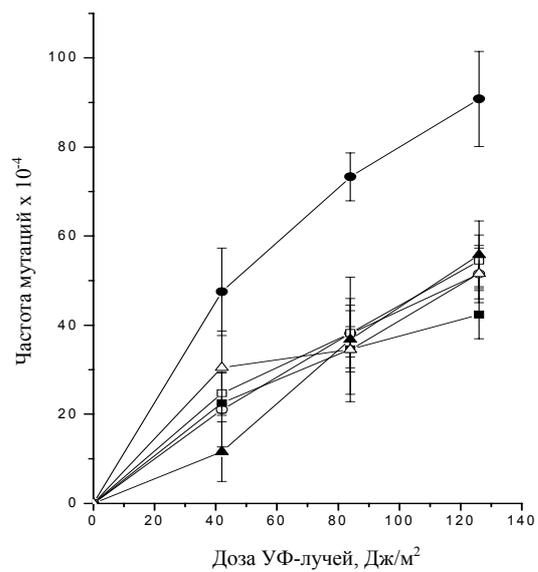


Рис. 5. Влияние гептронга на частоту мутаций в *ADE4-ADE8* локусах штаммов 5-LMG-3031 (*hsm3*) ●, ○; 2-IVF-312 (*pms1*) ■, □ и 12-SVK-3032 (*msh2*) ▲, △. Закрашенные символы – без гептронга, светлые символы – с гептронгом





Рецензенти: Моссе І.Б., д.б.н., професор;
Кутлахмедов Ю.О., д.б.н., професор

© Корольов В.Г., Ковальцова С.В., Федорова І.В., Грачова Л.М., 2009 Стаття надійшла 14.04.2009 р.