

ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКИЕ ЭФФЕКТЫ ВОДОРАСТВОРИМОЙ ФОРМЫ ГИПЕРИЦИНА У ДЕФИЦИТНЫХ ПО АНТИОКСИДАНТНОЙ ЗАЩИТЕ ОСОБЕЙ *DROSOPHILA MELANOGASTER*

© 2013 Е.А. Юшкова¹, В.Г. Зайнуллин¹, В.В. Пунегов¹, Г.Г. Зайнуллин²

¹Институт биологии Коми НЦ УрО РАН, г. Сыктывкар

²Институт химии Коми НЦ УрО РАН, г. Сыктывкар

Поступила 15.08.2013

Оценено влияние водорастворимой формы гиперцицина в разных концентрациях на частоту повреждений ДНК в нейробластах *sod* мутантных особей *Drosophila melanogaster*, имеющих нарушения в антиоксидантной защите (по Cu/ZnSod, MnSod изоферментам), и дрозофил дикого типа *Canton-S* с учетом его световой и темновой активации. Введение в питательную среду гиперцицина приводит к повышению в нейробластах личинок уровня повреждений ДНК. Генотоксические эффекты при световой активации гиперцицина наиболее выражены у *Sod*-мутантов. Для особей нормального фенотипа выявлена доза гиперцицина (1 мкМ), при которой частота разрывов ДНК ниже контроля. Установлена существенная зависимость биологической эффективности гидрофильного гиперцицина от его концентрации, генотипа животных и условий освещения. Предполагается, что исследуемая форма гиперцицина может проявлять антиоксидантное действие преимущественно через MnSod-активацию.

Ключевые слова: водорастворимая форма гиперцицина, повреждения ДНК, антиоксидантная защита, дрозофила.

В последнее время ведется активный поиск новых эффективных фармакологических средств, способных повышать общую резистентность организма. Важную роль в этом играет применение различных препаратов из природного растительного сырья, способных включаться в клеточный гомеостаз и обладающих, как правило, низкой токсичностью. Экспериментально наиболее изученным в качестве фотосенсибилизатора [2], антидепрессанта [7], а также агента антимикробной защиты [10] является гиперцицин – природный нафтодиантроновый пигмент, содержащийся в зверобое (сем. *Hypericaceae* Juss.).

Применяемый сегодня гиперцицин практически не растворим в водных средах, поэтому эффективность его использования, например в противоопухолевой терапии, наблюдается только совместно с токсичными растворителями (диметилсульфоксида, N-метил-пирролидона), необходимыми для "доставки" указанного пигмента в опухолевую ткань [13]. В других клинических исследованиях он применяется в составе водно-масляных эмульсий. В таком виде гиперцицин не стабилен и при введении в организм животного из-за фотосенсибилизации может привести к омертвлению тканей (некрозу), сопровождающееся интенсивным воспалительным процессом, или к летальному исходу.

В данном сообщении рассмотрено повреждающее ДНК действие химически чистого натив-

ного препарата гиперцицина, полученного методом флешхроматографии, в соматических клетках дрозофилы. За счет модификации гиперцицина на наночастицах достигается его растворимость и равномерное распределение в жидких средах организма, что может существенно изменить биологическую эффективность вещества и найти более широкое применение его в практике. Отметим, что ранее цитогенетические эффекты гиперцицина не изучались. Более того, использование в тестировании модифицированного гиперцицина разных генотипов дрозофилы, в частности с нарушениями в системе антиоксидантной защиты, позволит оценить механизмы, обуславливающие его эффект.

Цель работы — оценить действие гиперцицина на уровень образования повреждений ДНК в клетках особей *Drosophila melanogaster*, имеющих дефекты в антиоксидантной системе защиты.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В качестве объекта исследования использовали нейробласты (клетки нервных ганглиев) личинок дрозофил дикого типа *Canton-S* и линий (*Sod*ⁿ¹/+ с генотипом *Sod*[n1]*red*[1]/*TM3,Sb*[1]*Ser*[1]) и *sod2*^{Delta02}/+ с генотипом *y*[1]*w*[*]; *Sod2*[*Delta02*]/*CyO*) с мутациями генов цитоплазматической (*Cu/ZnSod*) и митохондриальной (*MnSod*) супероксиддисмутазы, участвующей в детоксикации свободных радикалов [9, 12]. Данные линии получены из дрозофилиной коллекции Центра в Блумингтоне (Университет штата Индиана, Блумингтон, США).

Питательную сахаро-агаровую дрожжевую среду обрабатывали экспериментальным образцом гиперцицина (водорастворимая форма) разной концентрации (1, 10, 20 и 100 мкМ), на которую

Юшкова Елена Александровна, кандидат биологических наук, научный сотрудник, отдел радиозоологии, ushkova@ib.komisc.ru; Зайнуллин Владимир Габдулович, доктор биологических наук, профессор, заведующий отделом радиозоологии, vzainullin@ib.komisc.ru; Пунегов Василий Владимирович, кандидат химических наук, старший научный сотрудник, отдел Ботанический сад, unegov@ib.komisc.ru

помещали родительские формы исследуемых линий дрозофилы для получения кладок. Обработку гиперидином проводили на протяжении всего развития дрозофил, от стадии яйца до личинки третьего возраста (общее время экспозиции для всех концентраций составило 5 суток). Контрольные варианты содержали на среде без добавления препарата. Новый экспериментальный образец гиперидина, выделенный из надземной массы зверобоя продырявленного (*Hipericum perforatum* L.), был модифицирован в гидрофильную форму путем иммобилизации его на наночастицах неорганической матрицы в Институте химии Коми НЦ УрО РАН.

Известно, что гиперидин может обладать фотосенсибилизирующим действием [11]. В этой связи эксперимент был запланирован с учетом световой и темновой активации препарата. Исследуемые генотипы дрозофилы, в состав диеты которых входил гиперидин, содержали в разных условиях освещения (при периодичности 12:12 ч, круглосуточном воздействии и в темноте). Интенсивность от лампы дневного света, измеряемая прибором «Lux light meter» DVM 1300 (Velleman, China), составила 70 лк.

Оценку повреждений ДНК в нейробластах, полученных из нервных ганглиев личинок дрозофил, проводили по методу «ДНК-комет» в нейтральных условиях электрофореза [1, 4]. Клеточную суспензию (10 мкл) смешивали с 0.5% легкоплавкой агарозой (100 мкл) и наносили на предметные стекла, предварительно покрытые слоем 1% нормальной агарозой, накрывали покровным стеклом и выдерживали при температуре 4.0 ± 0.1 °C в течение 20 мин. Стекла помещали в холодный лизирующий раствор (2.5 М NaCl, 10 мМ Na₂EDTA, 10 мМ Tris-HCl, 1% Triton X-100, pH 10.0) на 2 ч. По окончании лизиса препараты переносили в камеру для электрофореза с охлажденным нейтральным буфером (10 мМ Trizma-Base, 0.9 М борная кислота, 20 мМ Na₂EDTA, pH 8.2) на 20 мин. Электрофорез проводили в течение 20 мин при напряженности поля 0.7 В/см и силе тока 30 мА. После электрофореза стекла фиксировали в 70% этаноле в течение 15 мин.

Фиксированные препараты окрашивали флуоресцентным красителем SYBR Green («ДНК-синтез», 0.2 мкл/мл в TE-буфере, pH=7.5). Окрашенные препараты были проанализированы с помощью флуоресцентного микроскопа «Infiniti XS-148 FS». Обработку изображения «комет» вели с помощью специальной программы CometScore™ (версия 1.5, TriTek Corp.). Степень фрагментации ДНК оценивали по показателю момент «хвоста кометы» по П.Л. Оливе (ОТМ, Olive tail moment), равный произведению процентного содержания ДНК в «хвосте» на расстояние между центром ядра и центром флуоресцирующего «хвоста кометы» в условных единицах [8]. Эксперимент проводили в пяти повторно-

стях, всего было просчитано 500 клеток на вариант. Статистический анализ результатов проводили по t-критерию Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Согласно предварительным результатам оценки выживаемости имаго дрозофилы были определены минимальные и медианные действующие концентрации модифицированного гиперидина и они составили 1-5 и 10-20 мкМ, соответственно (данные не приведены).

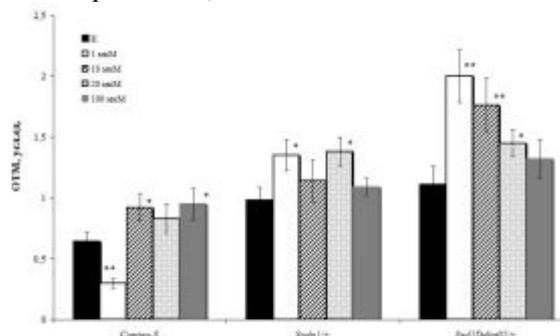


Рисунок 1. Уровень повреждений ДНК в нейробластах дрозофилы в контроле и после воздействия гиперидина в разных концентрациях. Примечание: * $p < 0.05$, ** $p < 0.001$ по сравнению с контролем (К).

В ответ на действие гиперидина обнаружена высокая вариабельность частоты повреждений ДНК, обусловленная генотипическими различиями и дозой тестируемого вещества. Показано (Рис. 1), что в условиях стандартного освещения (12:12 ч) относительно мутантных линий *Sod* особи дикого типа *Canton-S* оказались наименее чувствительными к воздействию препарата, значения ОТМ которой в зависимости от концентрации варьировали в пределах от 0.30 до 0.95. Действительно, спонтанные уровни нарушений ДНК у мутантных линий выше, чем у особей дикого типа *Canton-S* [15]. Для особей данной линии выявлена концентрация (1 мкМ) вещества, при которой частота повреждений ДНК достоверно ниже контроля, что позволяет предположить, что в физиологически значимых дозах действие гиперидина приводит к снижению уровня повреждений ДНК, вероятно в результате индукции процессов восстановления. Об этом свидетельствуют данные по частотам нарушений ДНК у мутантных линий, в клетках которых образование разрывов ДНК было выше при всех вариантах обработки, и тот факт, что при введении в диету линии *Canton-S* препарата в больших концентрациях наблюдали значимое увеличение количества поврежденных клеток, т.е. обнаруживали токсический эффект.

Поскольку точный механизм действия гиперидина не известен, было проведено тестирование препарата с использованием генотипов, имеющих нарушения в системе антиоксидантной защиты

(Рис. 1). Выраженный генотоксический эффект гиперицина, в отличие от *Sod^{+/+}* мутантов, был зарегистрирован у дефицитной по гену митохондриальной супероксиддисмутазы (*MnSod*) линии *Sod^{Delta02/+}*. При этом с повышением концентрации вещества частота фрагментации ДНК падала, что свидетельствует об ослаблении действия мутации после введения в диету животных препарата в концентрациях выше медианных. По-видимому, гидрофильная форма гиперицина способна проявлять антиоксидантные свойства в случае, когда уровень активности природных ан-

тиоксидантов (*Cu/ZnSod* и *MnSod*) достаточно низкий. Из этого следует, что влияя на интенсивность свободнорадикальных процессов, он защищает клетки от гибели. В то время как в клетках, претерпевающих неопластическую трансформацию, гиперицин может действовать через каспаз-зависимый апоптоз [3]. Более того, гиперицин может выступать мощным внутриклеточным катализатором, возбуждение которого приводит к выходу цитохрома с из митохондрий и активации апоптосомы [14].

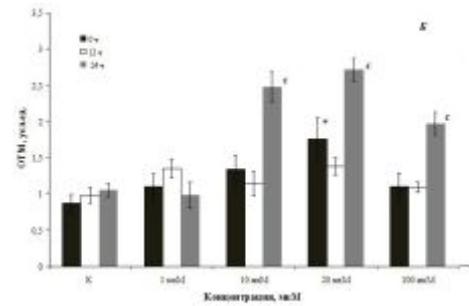
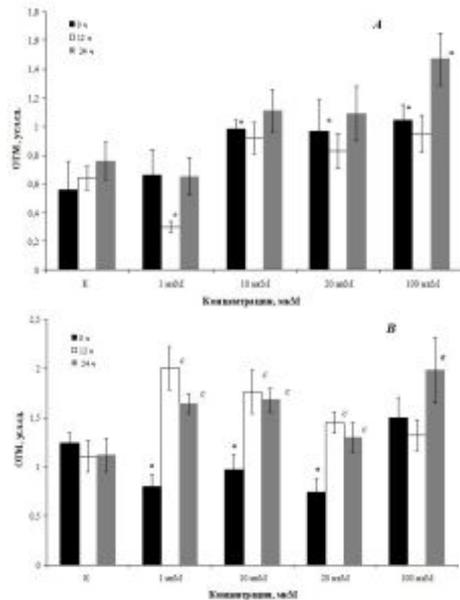


Рисунок 2. Уровень фрагментации ДНК в клетках дрозофил дикого типа (А), *Sod^{+/+}* (Б) и *Sod^{Delta02/+}* (В) мутантов, развивающихся в разных условиях освещения, после воздействия гиперицина. Примечание: различия статистически значимы при ^a*p* < 0.05, ^b*p* < 0.01, ^c*p* < 0.001 - между вариантами (0 ч, 12 ч и 24 ч); **p* < 0.05 – по сравнению с интактным вариантом при темновой активации гиперицина.

Используемые современные гиперицин-содержащие препараты чрезвычайно токсичны и могут привести к разрушению не только опухолевых, но и здоровых тканей вследствие высокой фотосенсибилизации пигмента. Это послужило основанием провести оценку фотосенсибилизирующего действия исследуемого экспериментального образца гиперицина (Рис. 2А-В). Как показано на рис. 2А, у линии дикого типа *Canton-S* не выявлены достоверные отличия между гиперицин-индуцированными эффектами при различных режимах освещения. Однако в зависимости от концентрации вещества обнаружена минимальная (при добавлении в диету 1 мкМ) и максимальная (при добавлении в диету 100 мкМ) световая токсичность водорастворимой формы гиперицина. В первом случае значения ОТМ составили 0.3 ± 0.04 , во втором – 1.47 ± 0.18 , соответственно. При этом токсичность препарата была усилена в условиях круглосуточного освещения.

У *Sod*-мутантов с нарушением детоксикации свободных радикалов биологическая эффективность гиперицина значимо зависела от условий освещенности (Рис. 2Б, В). Дрозофилы, имеющие мутацию гена *Cu/Zn*-цитоплазматической супероксиддисмутазы и содержащиеся в условиях

круглосуточного освещения, обладали высокой чувствительностью к действию вещества в концентрациях выше 1 мкМ (Рис. 2Б). Более выраженные цитотоксические эффекты при световой активации исследуемого образца гиперицина наблюдали в соматических клетках мутантных по гену *Mn*-митохондриальной супероксиддисмутазы особей *Sod^{Delta02/+}*, у которых образование количества ДНК-разрывов было повышено уже при минимальной его концентрации в 1 мкМ (Рис. 2В). Следует отметить, что для особей данного генотипа гиперицин может оказывать положительное действие в низких и средних концентрациях, снижая уровень фрагментации ДНК в клетках, но только при его темновой активации. Об этом свидетельствуют значения ОТМ, которые достоверно ниже контрольного уровня (1.24 ± 0.11) примерно в 1.5 раза и в зависимости от концентрации составляют 0.80 ± 0.12 (1 мкМ), 0.90 ± 0.13 (10 мкМ), 0.74 ± 0.11 (20 мкМ), соответственно.

Таким образом, в проведенном исследовании обнаружены принципиально новые особенности действия водорастворимой формы гиперицина. Наряду с цитогенетическим эффектом, гиперицин в зависимости от концентрации обладает антиоксидантной активностью у животных с генетиче-

ски детерминированным снижением антиоксидантной защиты. При этом его антиоксидантное действие проявляется преимущественно через MnSod-активацию. У особой нормального генотипа добавление в диету 1 мкМ раствора гиперичина приводит к снижению частоты фрагментации ДНК. Максимальная генотоксичность препарата выявлена для клеток *Sod*-мутантов при его световой активации.

Полученные результаты позволяют говорить о высокой биологической эффективности водорастворимой формы гиперичина.

Работа выполнена при финансовой поддержке Программы Президиума РАН, проект № 12-П-34-2009.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Зайнуллин В.Г. Радиационно-индуцированное изменение уровня двуцепочечных разрывов ДНК в нейробластах личинок и частоты летальных мутаций в половых клетках самцов *Drosophila melanogaster* / В.Г. Зайнуллин, Е.А. Юшкова, Д.В. Гурьев // Радиационная биология. Радиоэкология. 2010. Т. 50, № 5. С. 523–527.
2. Agostinis P. Hypericin in cancer treatment: more light on the way / P. Agostinis, A. Vantieghem, W. Merlevede, P.A. de Witte // Int. J. Biochim. Cell Biol. 2002. Vol. 34, № 3. P. 221–241.
3. Ali S.M. Induction of apoptosis by hypericin through activation of caspase-3 in human carcinoma cells / S.M. Ali, M. Olivo, G.Y. Yuen, S.K. Chee // Int. J. Mol. Med. 2001. Vol. 8. P. 521–530.
4. Bilbao C. Influence of *mus201* and *mus308* mutations of *Drosophila melanogaster* on the genotoxicity of model chemicals in somatic cells *in vivo* measured with the Comet assay / C. Bilbao, J.A. Ferreiro, M.A. Comendador, L.M. Sierra // Mutat. Res. 2002. Vol. 503, № 1. P. 11–19.
5. International Human Genome Sequencing Consortium: Initial sequencing and analysis of the human genome // Nature. 2001. Vol. 409, № 6822. P. 860–921.
6. Martínez-Poveda B. Hypericin in the dark inhibits key steps of angiogenesis *in vitro* / B. Martínez-Poveda, A.R. Quesada, M.A. Medina // Eur. J. Pharmacol., 2005. Vol. 5, № 16. P. 97–103.
7. Mennini T. The antidepressant mechanism of *Hypericum perforatum* / T. Mennini, M. Gobbi // Life Sci. 2004. Vol. 75, № 9. P. 1021–1027.
8. Olive P.L. Factors influence DNA migration from individual cells subjected to gel electrophoresis / P.L. Olive, D. Wlodek, R.E. Durand, J.P. Banath // Exp. Cell. Res. 1992. Vol. 198. P. 259–260.
9. Phillips J.P. *Drosophila* copper/zinc superoxide dismutase: Neuropathology and a model of dimer disequilibrium / J.P. Phillips, J.A. Tainer, E.D. Getzoff, G.L. Boulianne, K. Kirby, A.J. Hilliker // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1995. Vol. 92, № 9. P. 8574–8578.
10. Saddiqe Z. A review of the antibacterial activity of *Hypericum perforatum* L. / Z. Saddiqe, I. Naeem, A. Maimoona // J. Ethnopharmacol. 2010. Vol. 131, № 3. P. 511–521.
11. Schulz H.U. Investigation of the effect on photosensitivity following multiple oral dosing of two different *Hypericum* extracts in healthy men / H.U. Schulz, M. Schürer, D. Bässler, D. Weiser // Arzneimittelforschung. 2006a. Vol. 56. P. 212–221.
12. Sun J. Induced overexpression of mitochondrial Mn-superoxide dismutase extends the life span of adult *Drosophila melanogaster* / J. Sun, D. Folk, T.J. Bradley, J. Tower // Genetics. 2002. Vol. 161, № 2. P. 661–672.
13. Thong P.S. Hypericin-photodynamic therapy (PDT) using an alternative treatment regime suitable for multi-fraction PDT / P.S. Thong, F. Watt, M.Q. Ren, P.H. Tan, K.C. Soo, M. Olivo // J. Photochem. Photobiol. 2006. Vol. 82. P. 1–8.
14. Vantieghem A. Phosphorylation of Bcl-2 in G2/M phase-arrested cells following photodynamic therapy with hypericin involves a CDK1-mediated signal and delays the onset of apoptosis / A. Vantieghem, Y. Xu, Z. Assefa, J. Piette, J.R. Vandenhede, W. Merlevede, P.A. de Witte, P. Agostinis // J. Biol. Chem. 2002. Vol. 277, № 40. P. 37718–37731.
15. Woodruff R.C. Increased spontaneous DNA damage in Cu/Zn superoxide dismutase (SOD1) deficient *Drosophila* / R.C. Woodruff, J.P. Phillips, A.J. Hilliker // Genome. 2004. Vol. 47. P. 1029–1035.

CYTOGENETIC EFFECTS SOLUBLE FORM OF HYPERICIN IN DEFICIENT ANTIOXIDANT PROTECTION INDIVIDUAL *DROSOPHILA MELANOGASTER*

© 2013 E.A. Yushkova¹, V.G. Zainullin¹, V.V. Punegov¹, G.G. Zainullin²

¹Institute of Biology of Komi SC UB RAS, Syktyvkar

²Institute of Chemistry of Komi SC UB RAS, Syktyvkar

An assessment of the influence of water-soluble forms of hypericin in different concentrations on the frequency of DNA damage in neuroblasts of the *sod* mutant individuals *Drosophila melanogaster*, with disturbances in antioxidant defense (on Cu/ZnSod, MnSod isoenzyme) and wild-type flies *Canton-S* with the light and dark activation. Introduction to the culture medium of hypericin leads to an increase in larval neuroblasts level of DNA damage. Genotoxic effects at the light activation of hypericin most pronounced in the *Sod*-mutants. For normal individuals the phenotype revealed dose of hypericin (1 μM) in which the frequency of DNA breaks below the control. The strong dependence of the biological effectiveness of a hydrophilic hypericin on its concentration, the genotype animals and lighting conditions was established. It is assumed that the studied form of hypericin may exhibit antioxidant activity mainly through MnSod-activation.

Key word: water-soluble form of hypericin, DNA damage, antioxidant protection, *drosophila*.

Yushkova Elena Alexandrovna, Candidate of Biology, Research Fellow at the Radioecology Department, Institute of Biology of Komi SC UB RAS, e-mail: ushkova@ib.komisc.ru; Zainullin Vladimir Gabdullovich, Doctor of Biology, Professor, Head of the Department Radioecology, Institute of Biology of Komi SC UB RAS, vzainullin@ib.komisc.ru; Punegov Vasilij Vitalievich, Candidate of Chemistry, Superior Research Fellow at the Botanical Garden Department, Institute of Biology of Komi SC UB RAS, punegov@ib.komisc.ru