

О.Н. Антосюк, А.Ш. Мухаметзянова

Воздействие метотрексата на изменение интенсивности клеточной гибели в яичниках *Drosophila melanogaster*

Уральский федеральный университет имени первого Президента России Б.Н. Ельцина,
г. Екатеринбург

Целью данной работы является определение влияния различной концентрации метотрексата на апоптоз в яичниках *Drosophila melanogaster* при нормальной и повышенной температуре во время всего периода развития. В эксперименте было использовано 300 гибридных особей «Oregon-R × vg» со спонтанно возникшей мутацией фенотипа *Veadex*. Всего было шесть экспериментальных групп: контроль, группа с воздействием метотрексатом с концентрацией 400 мкг/кг питательной среды, 2000 мкг/кг, 10000 мкг/кг, воздействие температурой (28°C), и совместное воздействие метотрексатом 400 мкг/кг и температурой 28°C.

В ходе эксперимента было выявлено, что апоптоз в контрольной точке №1 (checkpoint № 1) достигает максимальных значений у группы МТХ10000 (10000 мкг/кг питательной среды) и у группы, онтогенез которой происходил с повышенной температурой (28°C). Также отмечена дозозависимость в отношении усиления апоптоза от увеличения концентрации в checkpoint № 1. У экспериментальной группы МТХ400 идет максимальная интенсификация клеточной гибели в контрольной точке №2 (checkpoint № 2), чего не наблюдается во всех остальных группах. В связи с тем, что применяемая доза (400 мкг/кг) близка к 50ЛД, вероятно, большая часть особей выживает, в отличие от групп с концентрацией 2000 мкг/кг и 10000 мкг/кг. Довольно высокий показатель наличия апоптоза в гермарию у группы контроля наблюдали у особей данной гибридной линии. Корреляции между увеличением дозы МТХ и степенью развития яичника не наблюдали. Однако группа МТХ2000 имеет высокий показатель атрофии обоих яичников.

Ключевые слова: метотрексат, атрофия, яичник, *Drosophila melanogaster*, онтогенез

Введение

Знания программируемой клеточной смерти важны в медицине при лечении онкологических, аутоиммунных и инфекционных заболеваний;

также в области трансплантологии; косметологии. Роль апоптоза в медицине заключается в возможности поиска путей регуляции этого процесса для лечения и профилактики многих патологических состояний, вызванных ослаблением или, наоборот, усилением апоптоза.

В медицине метотрексат уже давно активно применяют при лечении различных раковых заболеваний, также его используют против аутоиммунных расстройств. Возникновение многих тяжелых заболеваний связано с такими нарушениями программы клеточной гибели, при которых клетки либо перестают погибать, и тогда возможно возникновение опухолей, либо гибель захватывает избыточное число клеток, что в свою очередь приводит к патологической дегенерации тканей и органов. Комбинированная терапия позволяет достигнуть более быстрого и выраженного клинического эффекта, улучшает общие результаты лечения, оказывает замедляющее действия на рентгенологическое прогрессирование [2].

По сравнению с другими беспозвоночными, половая система *D. melanogaster* имеет много общего с репродуктивной системой млекопитающих, включая предполагаемые половые гормоны и консервативные белки, участвующие в развитии мочеполовой системы. Кроме того, *D. melanogaster* как модель представляет значительные преимущества по времени эксперимента и экономической эффективности по сравнению с моделями млекопитающих [4].

Метотрексат мало влияет на выживаемость *Drosophila melanogaster* взрослых мух, но значительно уменьшает плодовитость у самок, приводит к почти стерильности обработанных метотрексатом мух [3]. Яйца были меньше по размеру и имели короткие или отсутствующие хорионические придатки. Яйца, из которых все же развивались мухи, имели развитые меланотические опухоли и / или погибали во время более позднего развития. Небольшое число выживших взрослых мух имели опухоли и серьезные дефекты, в том числе аномалии щетины, глаз и лап. Похожий результат был получен при идентификации генов, отвечающих за реализацию токсичности химиотерапии. В настоящее время широко пред-

писанные химиотерапевтические средства, в том числе и метотрексат, снижают плодовитость у *D. melanogaster* в зависимости от дозы. Также была обнаружена довольно высокая степень наследования токсичности препарата [5, 6]. Помимо вышперечисленного, у дрозофилы происходит усиление апоптоза в крыловом имагинальном диске, впоследствии вызывающее наличие повреждения типа «вырезка» на крыловой пластинке имаго по полученным ранее данным [1].

Метотрексат подавляет передачу сигналов JAK / STAT человека, не затрагивая другие зависящие от фосфорилирования пути. Путь JAK / STAT трансформирует сигналы от нескольких цитокинов и контролирует гематопоэз, иммунитет и воспаление [8]. Яичник дрозофилы является хорошей системой для исследования регуляции фагоцитарной активности эпителиальными клетками, основным классом непрофессиональных фагоцитов. Во время оогенеза дрозофилы яйцевые камеры средней стадии подвергаются апоптозу зародышевой линии в ответ на лишение питательных веществ [7]. Программируемая клеточная смерть происходит на разных стадиях и в ответ на различные раздражители. Роль апоптоза в медицине заключается в возможности поиска путей регуляции этого процесса для лечения и профилактики многих патологических состояний. В связи с вышесказанным, планировали определить влияние различных концентраций метотрексата на апоптоз в яичниках при нормальной и повышенной температуре протекания онтогенеза, а именно влияние разных концентраций метотрексата в двух обозначенных контрольных точках (checkpoint № 1 и checkpoint № 2), наличие кумулятивного эффекта при повышении концентрации метотрексата и воздействии повышенной температурой разви-

тия, уровень атрофии яичников при различных концентрациях метотрексата при нормальной (24°C) и повышенной температуре (28°C).

Материалы и методы

В работе использовали гибридных особей «Oregon-R × vg» со спонтанно возникшей мутацией фенотипа Beadex. Всего было шесть групп: контроль, группа с воздействием метотрексатом концентрацией 400 мкг/кг, 2000, 10000, воздействием повышенной температурой (28°C), и совместным воздействием метотрексатом 400 мкг/кг и 28°C. Для приготовления препаратов органы извлекали в фосфатном буфере на предметном стекле, проводили окраску красителем акридинового ряда, после накрывания покровным стеклом просматривали препарат под флуоресцентным микроскопом, в течение 3–7 минут.

При обработке данных использовали ранжирование следующего типа: а) если апоптоза нет ни в одной из точек (checkpoint №1, checkpoint №2 — рис. 1) — то 0 баллов; б) если апоптоз наблюдается в checkpoint №1 (гермариарный) — то 1 балл; в) если апоптоз замечен в checkpoint №2 (виттеляриарный) — то 2 балла; д) если апоптоз присутствует в обеих точках — то 3 балла (табл. 1).

Если развитие яичника было нормальным применяли обозначение норма (полностью нормальный), если один яичник был недоразвит — атрофия 1 яичника, (один атрофирован) если оба яичника существенно недоразвиты, тогда атрофия 2-х яичников. Фотографирование препаратов осуществляли с помощью цифровой камеры Leica DFC 295, установленной на микроскоп Leica DM 500 B. Обработку цифровых изображений проводили с помощью программы LAS V4.2.

При проведении анализа данных использовали статистический метод χ^2 . Критерий « χ^2 Пирсона» являясь непараметрическим методом, позволяет сравнить качественные оценки объектов.

Результаты и обсуждение

При мутации *Beadex* (Vx) наблюдается потеря ткани по краю крыла. Впервые (Vx) идентифицирована в 1925 году. Мутация выступает

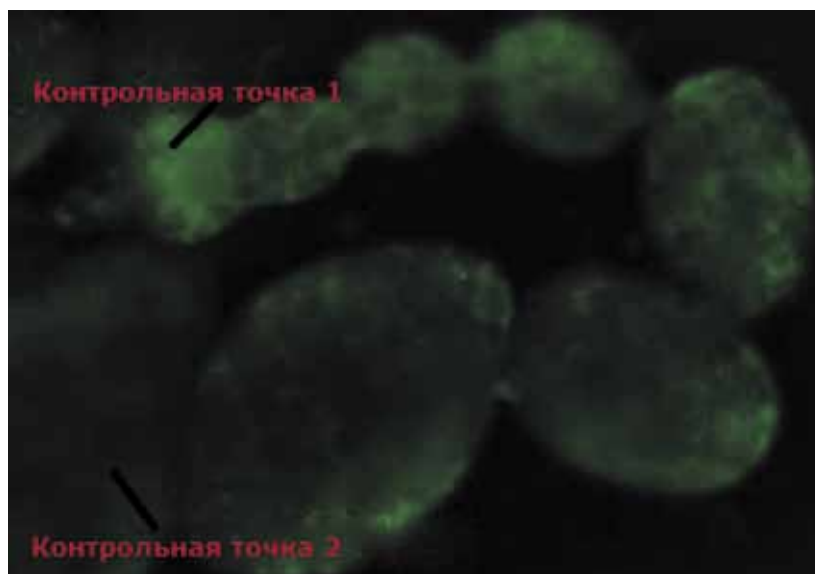


Рис. 1. Строение яйцевой трубки в яичнике *D. melanogaster* и локализация контрольных точек (checkpoint)

Таблица 1. Частота встречаемости клеточной гибели в экспериментальных группах

0 баллов 1 балл		Наличие апоптоза					Итого
		2 балла	3 балла				
Группа	Контроль	Частота	41	7	1	1	50
		% в группе	82,0%	14,0%	2,0%	2,0%	100,0%
	MTX400	Частота	34	5	10	1	50
		% в группе	68,0%	10,0%	20,0%	2,0%	100,0%
	MTX400+T (28°C)	Частота	43	6	1	0	50
		% в группе	86,0%	12,0%	2,0%	0,0%	100,0%
	MTX2000	Частота	41	8	1	0	50
		% в группе	82,0%	16,0%	2,0%	0,0%	100,0%
	MTX10000	Частота	36	12	2	0	50
		% в группе	72,0%	24,0%	4,0%	0,0%	100,0%
	T (28 C)	Частота	37	11	2	0	50
		% в группе	74,0%	22,0%	4,0%	0,0%	100,0%
Итого		Частота	232	49	17	2	300
% в группе			77,3%	16,3%	5,7%	0,7%	100,0%

Таблица 2. Степень развития яичника у разных экспериментальных групп

Экспериментальные группы	Развитие яичника		
	Норма (шт.)	Атрофия 1-го яичника (шт.)	Атрофия 2-х яичников (шт.)
Контроль	46	4	0
MTX400	44	5	1
MTX400+T (28 C)	50	0	0
MTX2000	13	0	37
MTX10000	40	6	4
T (28 C)	48	2	0

как доминантная, находится на X-хромосоме. Фенотип Vx, по-видимому, вызван избыточной активностью гена дикого типа *held — up*.

Развитие крыльев дрозофилы и развитие конечностей позвоночных имеет некоторые параллели. Выявлено, что гомолог у млекопитающих *dLMO*, *LMO-2* экспрессируется в развивающемся зародыше в соответствии с развитием конечностей. Ген *dLMO* является геном, контролирующим активность гена *Beadex*. Изучение структуры *dLMO* позволило установить, что он очень похож на человеческий ген, являющийся онкогеном. Гены *dLMO* дрозофилы и *LMO-2* человека гомологичны, они содержат идентичные последовательности на 83%. Изменение активности *Beadex* может происходить за счет инсерции мобильных генетических элементов в различные области гена *dLMO* [9].

Из шести сравниваемых групп: 1. Контроль и MTX400, 2. Контроль и MTX+T (28°C), 3. Контроль и MTX2000, 4. Контроль и MTX10000, 5. Контроль и T (28°C), 6. MTX400 и MTX400+T (28°C) только в двух группах Контроль и MTX400 и MTX400+T (28°C) замечены статистически значимые отличия. Значение критерия χ^2 у группы Контроль и MTX400 составил 8,35, а у группы MTX400 и MTX400+T (28°C) значение равно 9,51.

В табл. 2 представлены данные о степени развития яичника у различных групп, участвующих в эксперименте. Корреляции между увеличением дозы MTX и степенью развития яичника не наблюдали. Однако группа MTX2000 имеет высокий показатель атрофии обоих яичников. Это может быть связано с тем, что именно данная концентрация является критичной, в максимальной степени сказывающаяся на процессах развития гонад. Увеличение же концентрации до 10000 мкг/кг среды уменьшает размер яичников, к тому же, судя по литературным данным, размер самих особей, но уже не сказывается на развитии гонад [3].

Заключение

Обнаружена корреляция между используемыми в работе дозами метотрексата и усилением апоптоза в контрольной точке №1, тогда как в отношении контрольной точки №2 наибольшая степень апоптоза наблюдалась при наименьшей из концентраций (MTX400 мкг/кг), применяемых в работе. Не выявлен отрицательный кумулятивный эффект на изменение уровня апоптоза от совместного воздействия MTX400 + T (28°C). Соответственно, повышенная температура онтогенеза не усиливает токсические свойства ме-

тотрексата, которые, в свою очередь, не реализуются в виде более интенсивного апоптоза в яичнике у дрозофилы. Максимальная атрофия, выражающаяся в недоразвитии обоих яичников, наблюдалась нами при воздействии метотрексатом дозой 2000 мкг/кг среды. Возможно, по нашим предположениям, это может быть результатом высокой гибели особей с нормальным развитием гонад именно при этой концентрации.

ЛИТЕРАТУРА

1. Антосюк О.Н., Марвин А.М., Марвин Н.А. Сравнительный анализ воздействия цитостатических препаратов на нестабильность генома *Drosophila melanogaster* // Биомедицина. — 2014. — Т. 1. — №. 3. — С. 83–91.
2. Симонова О. В., Немцов Б. Ф. Комбинированная терапия метотрексатом и преднизолоном при ревматоидном артрите // Казанский медицинский журнал. — 2004. — Т. 85. — № 4. — С. 245–248.
3. Affleck J.G., Neumann K., Wong L. et al. The effects of methotrexate on *Drosophila* development, female fecundity, and gene expression // Toxicological Sciences. — 2005. — V. 89. — № 2. — P. 495–503.
4. Avanesian A., Semnani S., Jafari M. Can *Drosophila melanogaster* represent a model system for the detection of reproductive adverse drug reactions? // Drug discovery today. — 2009. — Vol. 14. — № 15-16. — P. 761–766.
5. Kislukhin G., Murphy M.L., Jafari M. et al. Chemotherapy induced toxicity is highly heritable in *Drosophila melanogaster* // Pharmacogenetics and genomics. — 2012. — Vol. 22. — № 4. — P. 285–289.
6. Kislukhin G., King E.G., Walters K.N. et al. The genetic architecture of methotrexate toxicity is similar in *Drosophila melanogaster* and humans // G3: Genes, Genomes, Genetics. — 2013. — Vol. 3. — №. 8. — P. 1301–1310.
7. Mondal T., Bag I., Garikapati K. R. et al. Two way controls of apoptotic regulators consign DmArgonaute-1 a better clasp on it // PLoS one. — 2018. — Vol. 13. — № 1. — P. 89 — 94.
8. Thomas S., Fisher K.H., Snowden J.A. et al. Methotrexate is a JAK/STAT pathway inhibitor // PLoS One. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0130078>.
9. Zeng C., Justice N. J., Abdelilah S. et al. The *Drosophila* LIM-only gene, dLMO, is mutated in Beadex alleles and might represent an evolutionarily conserved function in appendage development // Proceedings of the National Academy of Sciences. — 1998. — Vol. 95. — № 18. — P. 10637–10642.

Поступила в редакцию 21.08.2018 г.

O.N. Antosyuk, A.Sh. Mukhametzyanova

The influence of methotrexate on the change in the intensity of cellular death in the ovaries of *Drosophila melanogaster*

Ural Federal University named after the first President of Russia B. N. Yeltsin

Abstract: The purpose of this work to determine the influence of different concentration of methotrexate on apoptosis level in the ovaries of *Drosophila melanogaster* at normal and elevated temperature during development. In the experiment was used 300 hybrid individuals “Oregon-R x vg” with spontaneous mutation like Beadex phenotype. We investigated six group: control, a group after the methotrexate 400 mkg/kg medium treatment, a group with 2000 dose, a group with 10000 dose, temperature 28 C treatment and a group after methotrexate 400 and temperature 28 C treatment together. During the experiment we found that apoptosis in checkpoint #1 reaches to maximum values of the group MTX 10000 and of group after the temperature 28 C treatment. There was also a dose dependence on the intensity of apoptosis from increased concentration in checkpoint #1. The experimental group MTX 400 has the maximum intensification of cellular ath in the checkpoint #2, which is not observed in the other groups. Due to the fact that the 400mkg/kg is close to 50LD, probably most of the individuals survive. The high index of the presence of apoptosis observed in control group of this hybrid strain. Correlations between the increase in MTX dosesang degree of ovarian development were not observed. However, the 2000 MTX group has a high rate of atrophy of both ovaries.

Keywords : methotrexate, atrophy, ovary, *Drosophila melanogaster*, ontogenesis