

Генотоксические эффекты рибонуклеазы *in vivo*

О. Н. Ильинская, Х. Фрай¹

Казанский государственный университет
Ул. Кремлевская, 18, 420008, Казань, Российская Федерация

¹ Институт токсикологии университета Цюриха
Шоренштрассе, 16, Шверценбах, 8603, Швейцария

С помощью теста на индукцию мутаций и рекомбинации в соматических клетках крыльев *Drosophila melanogaster* (somatic mutation and recombination test, SMART) установлены токсические и генотоксические эффекты высоких концентраций рибонуклеазы *Bacillus intermedius*. Показано, что рибонуклеаза индуцирует генные мутации, регистрируемые по образованию клонов мутантных волосков типа *tw*h на крыльях мух, и вызывает морфологические изменения глаз *Drosophila*, выражающиеся в лизисе части глазных фасеток.

Введение. Перспективы терапевтического использования рибонуклеаз сегодня достаточно широки. Особенно детально изучено противоопухолевое действие онконазы, пиримидин-специфичной эндо-рибонуклеазы ооцитов лягушки [1, 2]. Несомненным преимуществом является ее нечувствительность к клеточному белковому ингибитору РНКаз [3, 4]. Это же свойство присуще и бактериальным рибонуклеазам — рибонуклеазе *Bacillus intermedius* (биназе) и ее ближайшему гомологу рибонуклеазе *B. amyloliquefaciens* (барназе). Противоопухолевый эффект биназы установлен в отношении асцитной формы карциномы Эрлиха и лимфолейкоза NKLy [5].

Считается, что фактор мутагенности нежелателен для терапевтических препаратов широкого спектра действия, однако ряд средств противоопухолевой терапии являются генотоксикантами. Что касается мутагенных свойств биназы, то они установлены в ряде бактериальных тест-систем [6, 7].

Нельзя не признать, что фактически бактериальные тест-системы также представляют собой систему *in vivo*, но особенности метаболизма одноклеточных организмов настолько отличны от вышших многоклеточных, что подобная терминология к ним не применяется. Тестирование на уровне целого организма учитывает метаболические превращения соединений, репарацию ДНК и фармакодинамику, но сопряжено с трудностью выбора доз,

способа обработки и установления контрольных параметров. Тесты *in vivo* должны заранее учитывать факт, что мутации происходят с низкой частотой, и если скрининг маркерного показателя у миллиона бактерий или в культуре клеток реален, то процедура обнаружения маркера у миллиона дрозофил весьма проблематична [8].

Традиционным является метод обнаружения генотоксичности в тесте сцепленных с полом рецессивных леталей *Drosophila* (SLRL), в результате которого появляется возможность детекции рецессивных летальных мутаций в 600—800 различных локусах X-хромосомы [9]. Однако система тестирования в половых клетках не совсем удобна для проверки действия слабых мутагенов, поскольку слишком большое число хромосом должно быть проанализировано.

Выявление генных мутаций и увеличения частоты митотической рекомбинации в соматических клетках *Drosophila melanogaster* (SMART) [10] представляет интерес в связи с возможностью обнаружения не только мутагенной, но и рекомбинагенной активности веществ по подсчету и классификации мутантных клонов волосков на крыльях *Drosophila*. Кроме того, в эксперименте действию подвергаются личинки мух, обладающие метаболической активностью для трансформации широкого спектра веществ, а мишенью регистрируемого впоследствии действия служат тысячи клеток имагинального диска [11].

Использование этого теста сокращает время

тестирования и расширяет спектр регистрации конечных мишеней действия генотоксикантов: наряду с мутациями, учитываемыми в тесте на сцепленные с полом рецессивные летали (точечные мутации, делеции, определенные типы хромосомных aberrаций), могут быть учтены также рекомбинационные эффекты и генная конверсия [10].

Целью настоящей работы явилась оценка токсических и мутагенных эффектов рибонуклеазы биназы на уровне целого организма плодовой мушки *D. melanogaster* в тесте SMART.

Материалы и методы. Фермент. В работе использована секретлируемая рибонуклеаза *B. intermedius* — биназа (молекулярная масса 12300 Да; pI 9,5; максимальная активность $14 \cdot 10^6$ Ед/мг при pH 8,5), изолированная из культуральной среды и очищенная до гомогенного состояния по методу, описанному Макаровым [12]. Энзиматические и физико-химические свойства фермента описаны Голубенко [13] и Балабан [14].

Тест на соматические мутации и рекомбинацию у *Drosophila* (SMART). Обработка мутагеном трансгетерозиготных личинок от скрещивания *D. melanogaster* линий с маркером *yellow* (самки: *mwh jv*, самцы: *flr³/TM3, Ser*) приводит к формированию фенотипически выраженных мутантных клонов клеток (*mwh* — множественные волоски вместо одного, *flr* — утолщенный или редуцированный волосок) на крыльях взрослых мух [10]. Личинок обрабатывали в хроническом опыте (действию тестируемого соединения подвергали трехдневных личинок в течение 48 ч до конечной стадии развития), добавляя вещество в стандартный корм (Instant Medium, Carolina Biological Supply Company, США).

В случае использованного стандартного скрещивания обработку веществом проводят для смешанной популяции личинок, поскольку на личиночной стадии фенотипические различия не проявляются. Необходимое для анализа потомство трансгетерозиготных личинок (*mwh flr⁺/mwh⁺ flr³*) отделяют на стадии взрослого насекомого, выбраковывая мух с маркером *Ser*. Для подсчета мутантных клонов отбирают крылья трансгетерозиготных мух обоих полов в равном отношении.

«Пятна» мутантных волосков подсчитывали на 48 крыльях 12 самок и 12 самцов, развившихся из одной опытной группы личинок (около 100 на дозу) и сгруппированных в один препарат. В случае сильного токсического действия один препарат может содержать несколько меньшее количество крыльев. Пятна классифицировали по фенотипу (одиночные, — содержащие мутантные волоски одного вида, и двойные, — содержащие оба типа

мутантных волосков) и размеру. В качестве негативного контроля использовали воду. Об увеличении частоты мутаций судили по превышению частоты образования одиночных пятен, об активации рекомбинации — по превышению частоты появления двойных пятен по сравнению с контролем.

Математическая обработка результатов. Статистический анализ проводили с использованием стандартных математических методов в программе Microsoft Excel: расчета среднеквадратичного отклонения внутри группы и *t*-теста Стьюдента. Результат в отдельной группе данных считали достоверным при отклонении внутри группы $\sigma < 15\%$, а критерий вероятности $p < 0,05$ принимали достаточным для достоверной разницы групп данных. С помощью специально созданной компьютерной программы анализировали результаты теста SMART [15].

Результаты и обсуждение. Мутантные клоны волосков на крыльях *Drosophila* подсчитывали у выживших мух, собранных в каждом из опытных вариантов. Параллельно оценивали токсическое действие различных концентраций исследуемого фермента по регистрации процентного содержания живых мух и погибших на исходной стадии либо на стадии куколки. Установлено, что токсическое действие биназы проявляется при концентрации фермента более 1 мг/мл среды, причем эффект имеет

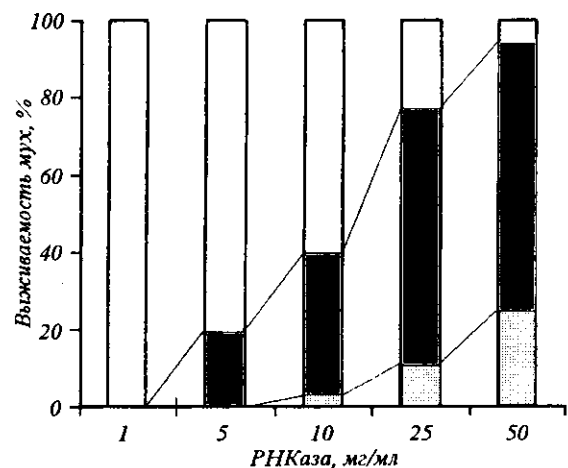


Рис. 1. Процентное содержание живых и мертвых особей при развитии взрослых мух из личинок, обработанных различными концентрациями биназы в условиях хронического опыта: светлые столбики — живые мухи; черные — мертвые куколки; серые — мертвые личинки

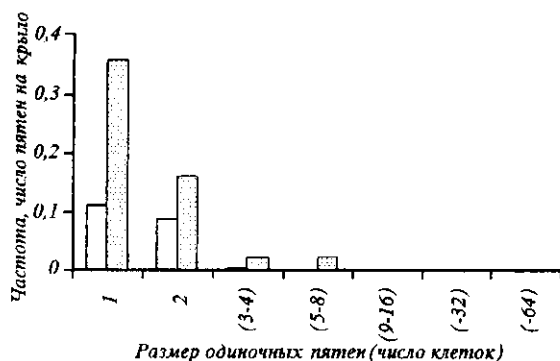


Рис. 2. Частота мутантных одиночных пятен разного размера на крыльях *Drosophila* после обработки личинок 5 мг/мл РНКазы в течение 48 ч (контрольный вариант с H₂O без РНКазы): светлые столбики — контроль, 96 крыльев; серые — обработка РНКазой, 48 крыльев

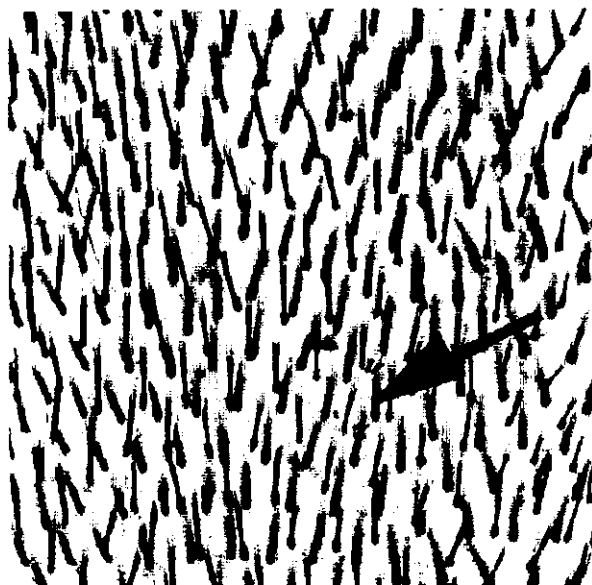


Рис. 3. Характерное пятно из двух мутантных клеток (тип *mwh*) на крыльях дрозофилы. Экспозиция личинок с РНКазой в течение 48 ч

ярко выраженный дозозависимый характер. Интересно отметить, что чем больше концентрация фермента в среде, тем больше процент гибели особей на исходной стадии личинки (рис. 1).

Результаты проведенных экспериментов показали, что биназа вызывает достоверное увеличение общего числа пятен одного типа (так называемых одиночных пятен, преимущественно фенотипа

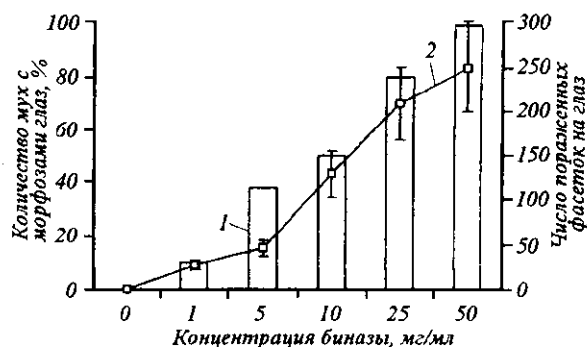


Рис. 4. Индукция биназой, содержащейся в составе питательной среды культивирования личинок, морфозов глаз взрослых мух *Drosophila*: 1 — количество мух с морфозами глаз; 2 — среднее число пораженных фасеток на глаз

mwh) малого размера, то есть состоящих менее чем из восьми мутантных клеток по сравнению с контролем. Расчет частоты появления мутантных одиночных пятен выявил наибольшее превышение частоты индуцированных РНКазой пятен для клонов минимального размера, состоящих из 1—2 клеток (рис. 2). Характерное мутантное пятно из двух клеток показано на рис. 3.

Отмечено, что биназа не индуцировала появления двойных пятен смешанного типа, содержащих как клон клеток *mwh*, так и *flr* и свидетельствующих о рекомбинагенном эффекте тестируемого соединения. Число индуцированных одиночных пятен возрастало с увеличением концентрации фермента в среде. При использовании в эксперименте высоких концентраций биназы (25 мг/мл среды и выше) подсчет был затруднен в связи с преобладанием токсического действия фермента и массовой гибелью особей на всех стадиях развития. Суммарные данные определения генотоксических эффектов РНКазы представлены в таблице.

Очевидно, что величина мутантного клона клеток позволяет судить о том, на какой стадии развития мутаген оказал действие на тест-объект: обнаружение крупных индуцированных пятен подразумевает, что мутировавшая клетка претерпела несколько делений, а наличие мелких пятен свидетельствует о том, что соединение вызвало генотоксический эффект на поздних стадиях развития личинки, когда интенсивное деление клеток имагинального диска закончилось. В связи с этим можно считать, что проявление мутагенного действия бактериальной РНКазы происходит в период III, по-

Суммарные результаты анализа биназы в тесте SMART с использованием стандартного скрещивания

Концентрация биназы, мг/мл	Число крыльев	Число пятен на крыло (общее число пятен)*				Число пятен клона <i>т/л/л</i>	Средний размер клона	Частота образования клона ($\cdot 10^{-5}$)**	
		Одиночные пятна до двух клеток	Одиночные пятна более двух клеток	Двойные пятна	Общее число пятен			Регистрируемая	С учетом контроля
Контроль	96	0,19 (18)	0,03 (3)	0,01 (1)	0,23 (22)	22	1,91	0,9	
1	48	0,17 (8)-	0,04 (2) <i>i</i>	0,00 (0) <i>i</i>	0,21 (10)-	10	1,90	0,9	0
5	48	0,54 (26)+	0,06 (3) <i>i</i>	0,00 (0) <i>i</i>	0,60 (29)+	29	1,52	2,5	1,5
10	96	0,58 (56)+	0,06 (6) <i>i</i>	0,01 (1) <i>i</i>	0,65 (62)+	60	1,73	2,6	1,7
25	42	0,48 (20)+	0,07 (3) <i>i</i>	0,02 (1) <i>i</i>	0,57 (24)+	24	1,58	2,3	1,4

*Статистический анализ мутагенности образца согласно [15] в сравнении с контролем: «+» — положительный результат; «-» — отрицательный результат; *i* — недостоверное отличие; **частота образования клона: число клонов *т/л/л*/число крыльев/24400 клеток (без учета размера клона).

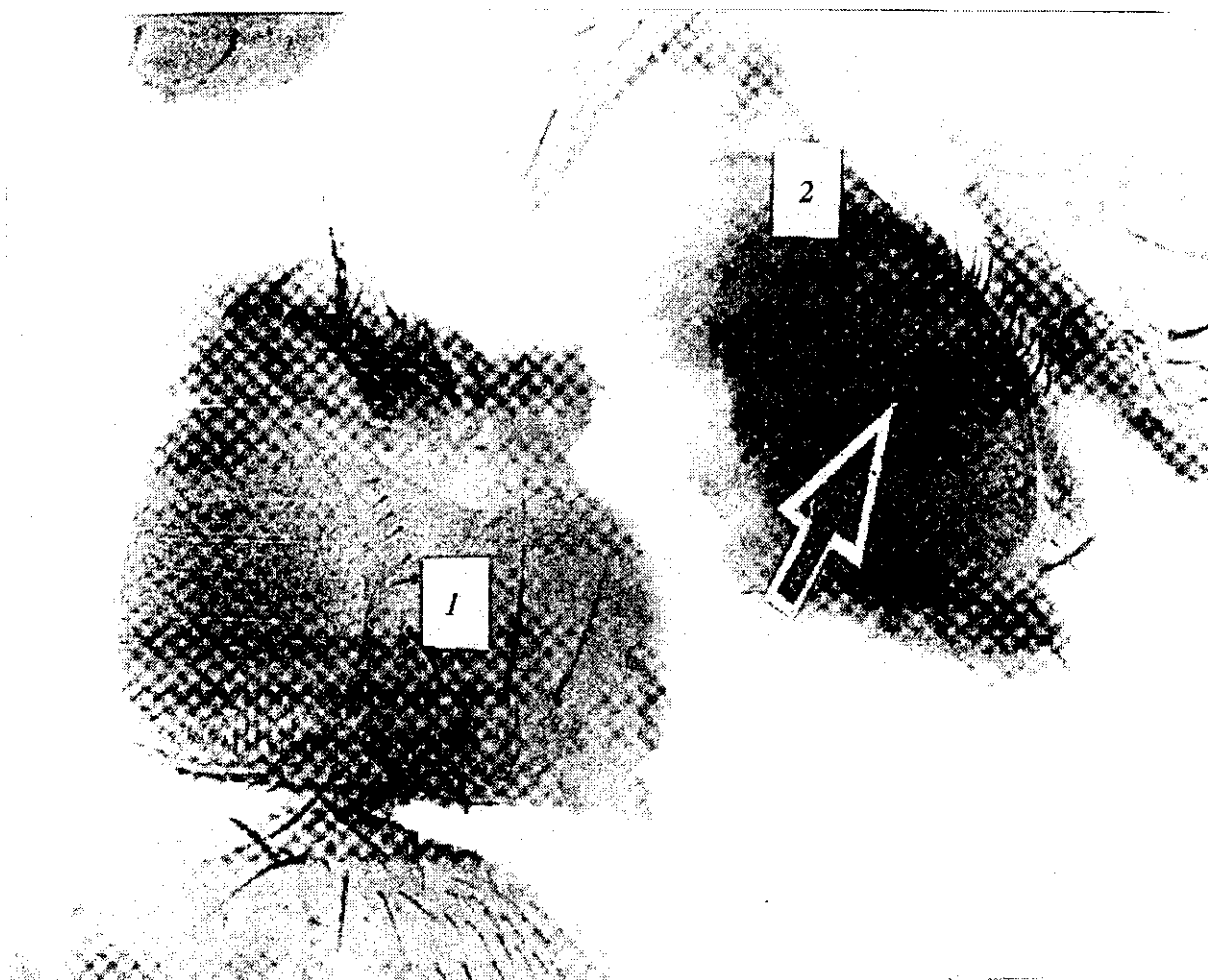


Рис. 5. Морфозы глаз дрозофил, развившихся из личинок, обработанных биназой: 1 — контрольный вариант без биназы; 2 — 5 мг/мл биназы

следней личиночной стадии. Это приводит к индукции образования малых по размеру одиночных пятен.

Токсическое действие биназы на обрабатываемые личинки вызвало появление морфозов у взрослых насекомых, выразившихся в лизисе мембран фасеток глаза, причем интенсивность поражения фасеток находилась в прямой зависимости от концентрации фермента в среде и проявлялась как в увеличении числа мух с пораженными глазами, так и в возрастании количества числа пораженных фасеток в расчете на глаз (рис. 4, 5).

Интерпретация результатов проведенного исследования приводит к выводу о том, что в высоких концентрациях биназа обладает способностью индуцировать мутации в клетках *Drosophila*, при этом, вероятно, нарушения процессов рекомбинации не происходит.

Данные о мутагенном эффекте биназы были получены нами ранее в бактериальных тест-системах, причем было показано, что метаболическая активация ферментами микросом печени млекопитающих приводила к исчезновению мутагенного эффекта [6]. Тем не менее, на уровне целого эукариотического организма *D. melanogaster* метаболические превращения тестируемого фермента не приводят к исчезновению у него мутагенных свойств. Учитывая выраженное токсическое действие высоких концентраций фермента, можно предположить, что нарушения в генетическом материале происходят вследствие первичных цитотоксических изменений.

О. Н. Ільїнська, Х. Фрай

Генотоксичні ефекти рибонуклеази *in vivo*

Резюме

За допомогою тесту на індукцію мутацій і рекомбінації в соматичних клітинах крил *Drosophila melanogaster* (somatic mutation and recombination test, SMART) виявлено токсичні і генотоксичні ефекти високих концентрацій рибонуклеази *Bacillus intermedius*. Показано, що рибонуклеаза індуктує генні мутації, які ресструються по утворенню клонів мутантних волосків типу *mwh* на крилах мух, та призводить до появи морфологічних змін очей *Drosophila*, зокрема лізису частини очних фасеток.

O. N. Ilinskaya, H. Frei

Genotoxic effects of ribonuclease *in vivo*

Summary

The toxic and genotoxic effects of *Bacillus intermedius* ribonuclease at high concentrations have been established using somatic mutation and recombination test (SMART) with *Drosophila melanogaster*. It has been shown that ribonuclease induces gene mutations detected as single spots of mutant hairs of *mwh* (multiple wing hairs) phenotype on the wing blade, and leads to the morphological

alterations of the *Drosophila* eyes, in particular to the lysis of a part of facets.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Mikulski S. M., Chun H. G., Mittelman A., Panella T., Puccio C. A., Shogen K., Costanzi J. J. Relationship between response rate and median survival in patients with advanced non-small cell lung cancer: comparison of onconase with other anticancer agents // *Int. J. Oncol.*—1995.—6.—P. 889—897.
2. Boque L., Wlodawer A. Of frogs and men: attempts to humanize onkonase // *Absr. 4th Int. Meet. «Ribonucleases: Chemistry, Biology, Biotechnology»* (Groningen, 14—18 July, 1996).—Groningen, 1996.—S3L5.
3. Saxena S. K., Rybak S. M., Winkler G., Meade H. M., McCray P., Youle R. J., Ackerman E. J. Comparison of RNAses and toxins upon injection into *Xenopus* oocytes // *J. Biol. Chem.*—1991.—266.—P. 21208—21214.
4. Saxena S. K., Vasandary V. M., Ardelt W., Boix E., Wu Y. N., Youle R. J. The mechanism of onconase toxicity and antiviral activity // *Absr. 4th Int. Meet. «Ribonucleases: Chemistry, Biology, Biotechnology»* (Groningen, 14—18 July, 1996).—Groningen, 1996.—S3P4A.
5. Куриненко Б. М., Собчук Л. И., Хайбуллина С. А., Карпова С. И. Противоопухолевая активность рибонуклеази *Bacillus intermedius* 7P // *Эксперим. онкология.*—1988.—6.—С. 54—57.
6. Ilinskaya O. N., Ivanchenko O. B., Karamova N. S. Bacterial ribonuclease: mutagenic effect in microbial test-systems // *Mutagenesis.*—1995.—10, N 3.—P. 165—170.
7. Ilinskaya O. N., Ivanchenko O. B., Karamova N. S., Kipenskaya L. V. SOS-inducing ability of native and mutant microbial ribonucleases // *Mutat. Res.*—1996.—354.—P. 203.
8. Casarett and Doull's toxicology: the basic science of poisons / Eds C. D. Klaassen, M. O. Admur, J. Doull.—New York: McGraw-Hill, 1996.—1111 p.
9. Mason J. M., Aaron C. S., Lee W. R. A guide for performing germ cell mutagenesis assay using *Drosophila melanogaster* // *Mutat. Res.*—1987.—189.—P. 93—102.
10. Graf U., Wurgler F. E., Katz A. J., Frei H., Juon H., Hall C. B., Kale P. G. Somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster* // *Environ. Mutagen.*—1984.—6.—P. 153—188.
11. Vogel E. W. Tests for recombinagens in somatic cells of *Drosophila* // *Mutat. Res.*—1992.—284.—P. 159—175.
12. Makarov A. A., Protasevich I. I., Kuznetsova N. V. et al. Comparative study of thermostability and structure of close homologues — Barnase and Binase // *J. Biomol. Struct. and Dynam.*—1993.—10.—P. 1047—1065.
13. Голубенко И. А., Балабан Н. П., Лецинская И. Б., Волкова Т. И., Клейнер Г. Т., Чепурнова Н. К., Афанасенко Г. А., Дудкин С. М. Рибонуклеаза *Bacillus intermedius* 7P: очистка хроматографией на фосфоцеллюлозе и некоторые свойства гомогенного фермента // *Биохимия.*—1979.—44.—С. 640—648.
14. Balaban N. P., Scharipova F. R., Golubenko I. A., Aphanasenko G. A., Volkova T. I., Vershinina V. I., Znamenskaya L. V., Leschinskaya I. B. Physico-chemical characteristics of ribonuclease *Bacillus intermedius* // *Proc. Ist. Int. Meet. «Structure and chemistry of ribonucleases»* (Moscow, 28 Nov.—2 Dec. 1988).—M., 1989.—P. 349—352.
15. Frei H., Wurgler F. E. Statistical methods to decide whether mutagenicity test data from *Drosophila* assays indicate a positive, negative or inconclusive result // *Mutat. Res.*—1988.—203.—P. 297—308.

УДК 577.29:575224

Поступила в редакцию 15.06.99