

## ВЛИЯНИЕ АМИОДАРОНА НА УЛЬТРАСТРУКТУРУ ДРОЖЖЕЙ *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*

© С. М. Ожован,<sup>1,2</sup> Д. А. Кнорре,<sup>2</sup> Ф. Ф. Северин,<sup>2</sup> Л. Е. Бакеева<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>Факультет биоинженерии и биоинформатики и

<sup>2</sup>Научно-исследовательский институт физико-химической биологии им. А. Н. Белозерского  
Московского государственного университета им. М. В. Ломоносова;

\* электронный адрес: bakееva@imec.msu.ru

Изучена ультраструктура дрожжевых клеток *Saccharomyces cerevisiae* (контрольных и мутантных по гену *usp2*), обработанных амиодароном. Амиодарон используется в медицинской практике как лекарственное средство при лечении ряда заболеваний. Однако известно, что амиодарон вызывает структурные и функциональные нарушения в тканях пациентов. Особенности проявления действия амиодарона на организм в настоящее время активно изучаются и на дрожжевых клетках *S. cerevisiae*, где показано, что амиодарон запускает программу самоубийства. Электронно-микроскопическое исследование клеток дрожжей *S. cerevisiae* при действии амиодарона выявило значительное повышение уровня содержания в клетках липидных включений (ЛВ), которые, контактируя с мембранными органеллами клетки, образуют единый структурный комплекс. Действие амиодарона сопровождалось появлением в клетках мелких, одиночных, незначительно набухших митохондрий. В ядрах наблюдались смещение хроматина к периферии, отшнуровывание фрагментов ядра и нарушение непрерывности ядерной оболочки. Предполагается, что выявленные изменения ультраструктуры клеток *S. cerevisiae* являются специфическим ответом на развитие процессов фосфолипидоза и апоптоза, вызываемых амиодароном.

**Ключевые слова:** дрожжи *Saccharomyces cerevisiae*, апоптоз, фосфолипидоз, ультраструктура клетки, липидные капли, амиодарон.

Амиодарон (2-бутил-3-(3,5-дйод-4-диэтиламиноэтоксibenзоил)-бензофуран) является эффективным противоаритмическим агентом (Heger et al., 1981). Данное вещество используется при лечении желудочковой и субжелудочковой аритмий, внезапной остановки сердца, а также способствует предотвращению гибели миокарда после инфаркта (Singh, 1996; Bolt et al., 2001). Однако амиодарон имеет побочные, опасные для жизни и здоровья эффекты — токсичный фиброз, легочную токсичность и поражение печени при длительном лечении (Kannan et al., 1989; Bolt et al., 2001). Показано, что амиодарон вызывает структурные и функциональные изменения клеток различных тканей (De la Iglesia et al., 1975; Dake et al., 1985; Somani et al., 1987; Pirovino et al., 1988; Fromenty et al., 1990; Campbell et al., 1994; Yasuda et al., 1996; Bolt et al., 2001). Наиболее характерное морфологическое изменение ткани — появление большого количества лизосом в гепатоцитах, купферовских клетках и эпителии желчного протока (De la Iglesia et al., 1975; Pirovino et al., 1988). Менее выражен этот эффект в клетках эндотелия, гладких мышцах и соединительной ткани. В тканях пациентов, принимавших амиодарон, показано наличие обширных миелиноподобных образований в макрофагах, пневмоцитах, тканях легкого, кардиомиоцитах и в соединительных тканях (Dake et al., 1985; Gross, Somani, 1986; Somani et al., 1987).

Механизм амиодароновой токсичности исследуется и на *Saccharomyces cerevisiae* (Gupta et al., 2003; Zhang, Rao, 2007); показано, что амиодарон запускает в клетках про-

грамму самоубийства, сопровождаемую появлением маркеров программируемой клеточной смерти (Pozniakovsky et al., 2005). Под действием этого препарата наблюдаются события, напрямую связанные с митохондриями: увеличение скорости дыхания, резкий подъем трансмембранного потенциала, генерация активных форм кислорода комплексом III дыхательной цепи, фрагментация митохондрии и выход цитохрома *c* в цитоплазму. Было обнаружено, что клетки *S. cerevisiae*, мутантные по гену *usp2*, являются более устойчивыми к амиодарону (Knorre et al., 2008).

Таким образом, на сегодня известно, что амиодарон, используемый в терапевтических целях, вызывает значительные изменения ультраструктуры клеток различных тканей, а также является индуктором апоптоза дрожжевых клеток. Поэтому представляло большой интерес исследование ультраструктуры клеток дрожжей *S. cerevisiae* (контрольных и мутантных по гену *usp2*) при действии амиодарона.

### Материал и методика

**Культура клеток.** Использованы следующие штаммы дрожжей *S. cerevisiae*: W303-1A и изогенный ему штамм *Dusp2* (*usp2::TRP1*). Клетки выращивали до стационарной фазы роста (~10<sup>8</sup> кл./мл) в богатой среде, содержащей в качестве источника углерода глюкозу (2 %) или раффинозу (2 %), согласно протоколу, опубликован-

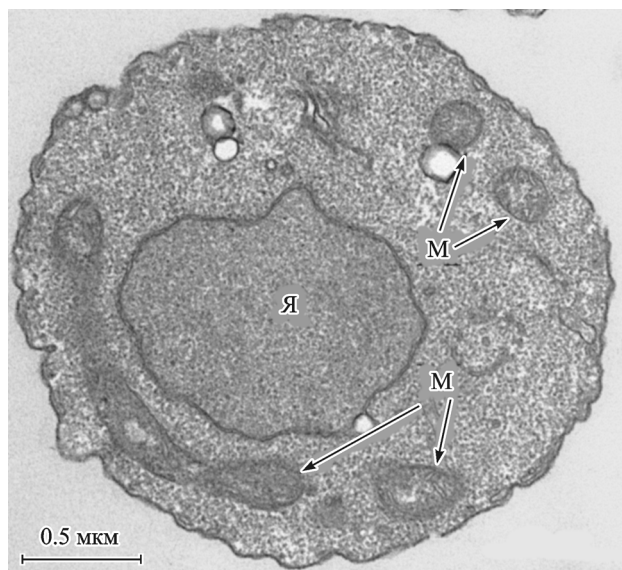


Рис. 1. Ультраструктура клетки *Saccharomyces cerevisiae* дикого типа.

Я — ядро, М — митохондрия.

ному ранее (Sherman, 2002). Перед началом эксперимента концентрацию клеток штаммов W303 и *Dysp2* устанавливали равной  $5 \cdot 10^7$ .

**Индукция клеточной смерти.** Клетки выращивали до стационарной фазы роста в жидкой среде и инкубировали в среде, содержащей глицерин (2 %) и MES (25 mM, pH 5.5), в течение 2—5 мин. Затем добавляли амиодарон до конечной концентрации 40 мкМ.

**Электронная микроскопия.** Для электронной микроскопии использовали протокол, описанный ранее (Yang et al., 2006). Клетки дикого типа и мутантные *Dysp2* были взяты в объемах 900 и 1000 мкл соответственно. Затем пробы центрифугировали (5 мин, 4000 g) и отмывали в PBS (pH 7.2). Пробы суспензии клеток дикого типа и мутанта *Dysp2*, кроме контрольных, перед фиксацией инкубировали 10 мин в 40 мкМ амиодароне. Первоначально фиксацию клеток проводили 2%-ным глутаральдегидом и 1 mM  $\text{CaCl}_2$  на натриевом какодильном буфере (pH 7.2) в течение 30 мин при 4 °C. Затем клетки отмывали от глутаральдегида в холодном буфере 3 раза. Ферментативный гидролиз клеточной стенки проводили в буфере (50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 5 mM  $\text{MgCl}_2$ , 1.4 M сорбитол и 0.5%-ный  $\beta$ -меркаптоэтанол), в который добавляли 15 мкл зимолиазы (20 мг/мл, Sigma). Реакцию проводили в течение 10 мин при 30 °C. Далее клетки отмывали 4 раза по 5 мин в 0.1 M натриевом какодильном буфере. Вторичную фиксацию проводили в 1%-ном тетроксиде осмия и 1%-ном ферроцианиде калия, растворенных в дистиллированной воде (инкубация 2 раза по 5 мин при 4 °C). Отмывали 3 раза в 0.1 M натриевом какодильном буфере и 1 раз в дистиллированной воде. Пробы инкубировали в 1%-ном уранил-ацетате 90 мин при комнатной температуре и отмывали 4 раза по 5 мин в дистиллированной воде. Дегидратацию проводили в 50%-ном спирте, затем его заменяли на 75, 85 и 96%-ный спирт при 4 °C. Материал заливали в эпоксидную смолу Эпон-812. Срезы делали на ультрамикротоме фирмы Leica Ultracut UCT, окрашивали свинцом (Reynolds, 1963). Полученные препараты исследовали в электронном микроскопе H-700 (Hitachi, Япония).

## Результаты

На рис. 2—4 показана ультраструктура клеток *S. cerevisiae* дикого типа, проинкубированных с амиодароном (40 мкМ) в течение 2—5 мин. При сопоставлении с карти-

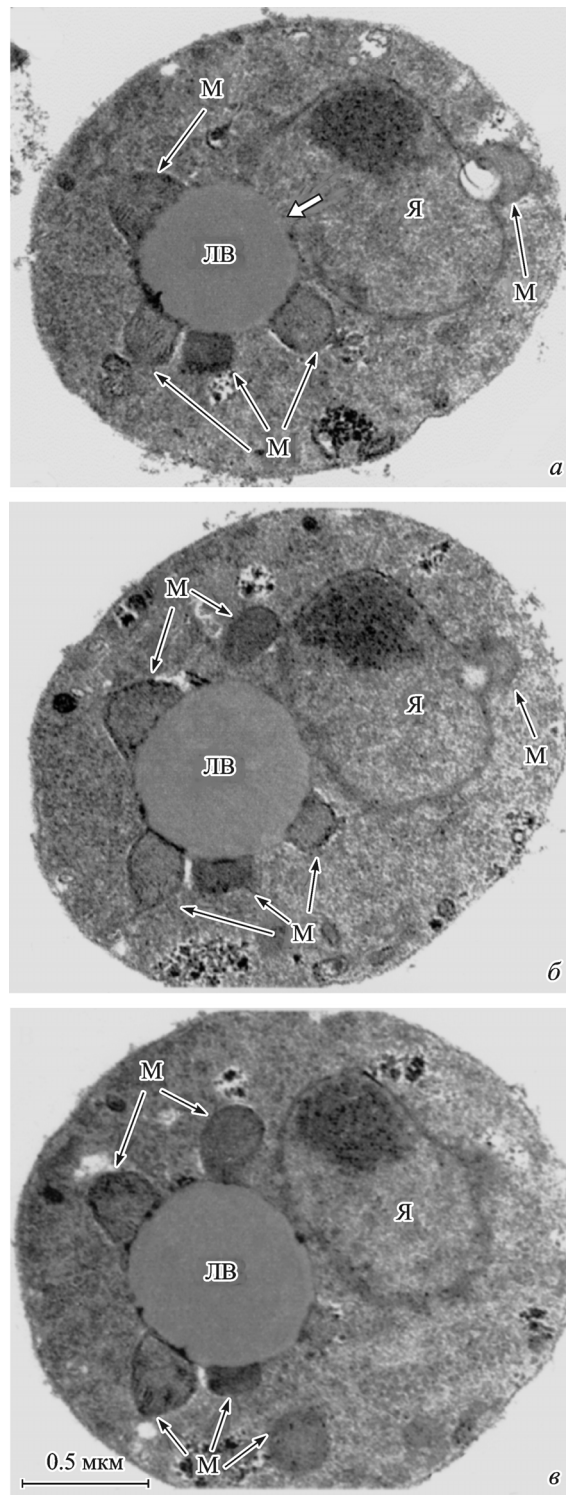


Рис. 2. Ультраструктура клетки *Saccharomyces cerevisiae* дикого типа при кратковременной инкубации в течение 2—5 мин с амиодароном (40 мкМ).

а—в — серийные срезы одной клетки. Видны маргинализация хроматина ядра, ассоциация митохондрий (М, стрелки), ядра (Я) и липидных включений (ЛВ). Тройной комплекс показан белой стрелкой.

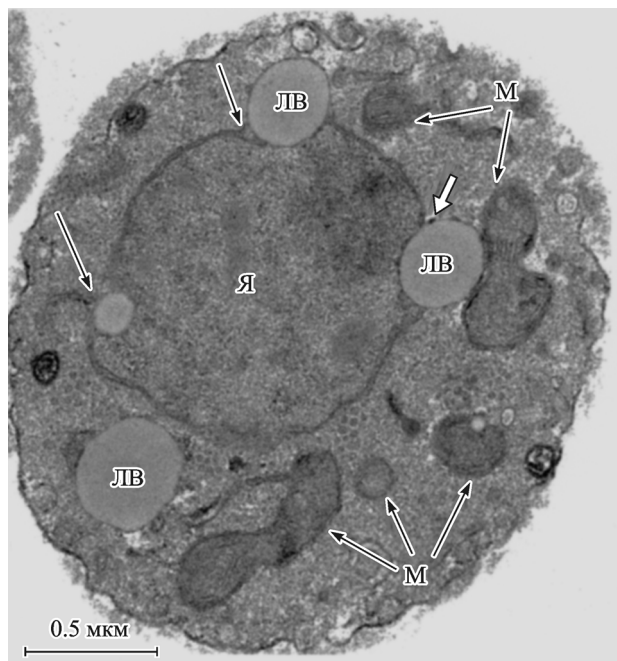


Рис. 3. Ультраструктура клетки *Saccharomyces cerevisiae* дикого типа при кратковременной инкубации в течение 2—5 мин с амиодароном (40 мкМ).

Видна маргинализация хроматина ядра. Ассоциация ядра (Я) и липидных включений (ЛВ) показана стрелками. Образование тройного комплекса, образованного ядром, липидной каплей и митохондрией (М), показано белой стрелкой. Стрелками показаны участки отхождения ядерной мембраны.

ной клеток *S. cerevisiae*, не обработанных амиодароном (рис. 1), можно видеть, что амиодарон вызывает значительные изменения ультраструктуры дрожжевых клеток. Прежде всего обращает на себя внимание возникновение необычного структурного объединения, включающего в себя митохондрии, ядро и липидные включения (ЛВ). Ультратонкие срезы через всю клетку позволяют проследить объединение митохондрий, ядра и ЛВ (отдельные последовательные срезы представлены на рис. 2, а—в). Ядерная оболочка в местах контактирования с ЛВ образует расширения межмембранного пространства (рис. 3), что позволяет предположить возможность непосредственного контактирования ЛВ с хроматином ядра. В клетке на рис. 3 сразу несколько ЛВ плотно прилегают к ядру, в то время как на рис. 2 можно видеть лишь одну, чрезвычайно крупную, липидную каплю, одновременно контактирующую с ядром и митохондриями клетки.

Наряду с изменением пространственной организации органелл в клетках *S. cerevisiae* мы наблюдали изменение ультраструктуры непосредственно органелл клетки при действии амиодарона. Митохондрии были незначительно набухшими, мелкими, протяженные формы отсутствовали. На большинстве электронно-микроскопических фотографий, приведенных в настоящей работе, видна «маргинализация» (смещение к одному краю ядра) хроматина — характерный ультраструктурный признак начальных стадий развития апоптоза. Другой характерный ультраструктурный признак, показывающий, что клетки окончательно вступили на путь апоптоза — разрушение ядра с отпочковыванием отдельных участков, — также отчетливо виден на последовательных срезах (рис. 4). Видно, что ядро клетки «открыто», отсутствует непрерывность ядер-

ной оболочки: концы ядерных мембран не замкнуты, расположены «свободно». Также отчетливо видно, что ядро имеет фрагмент, соединенный через узкий канал с основной частью ядра (рис. 4, стрелки).

В клетках *S. cerevisiae*, мутантных по гену *usp2*, при действии амиодарона нами также выявлены аналогичные ультраструктурные изменения, однако они были единич-

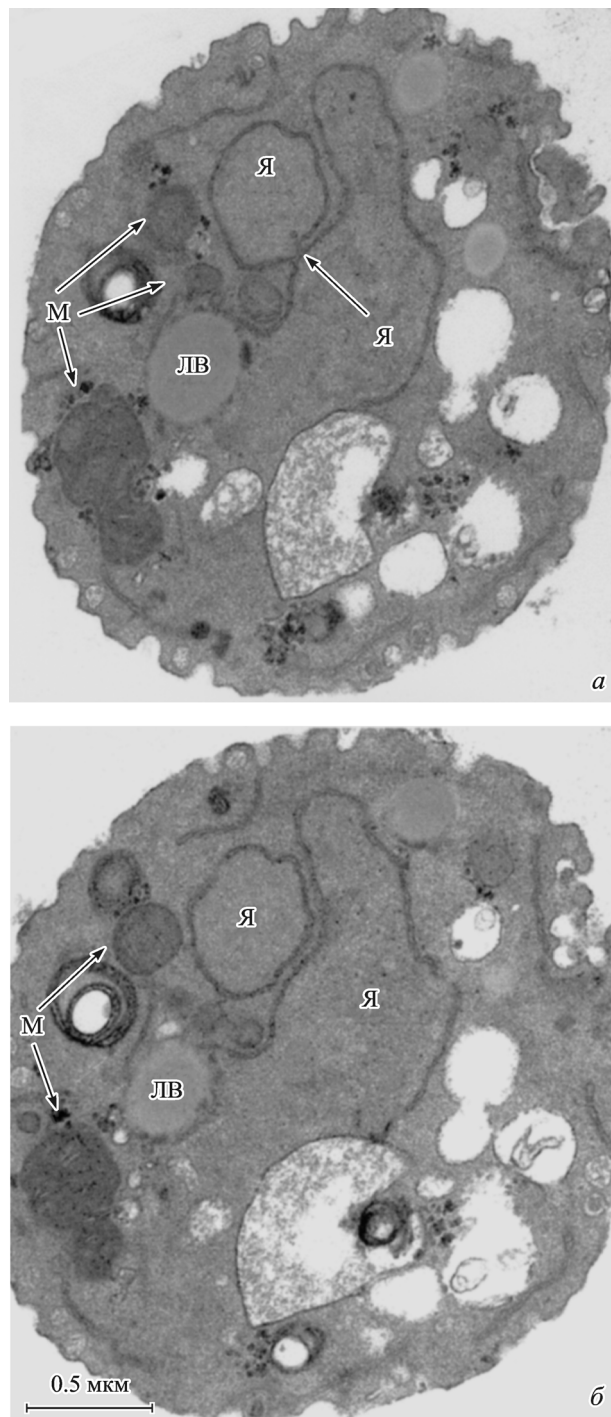


Рис. 4. Ультраструктура клетки *Saccharomyces cerevisiae* дикого типа при кратковременной инкубации в течение 2—5 мин с амиодароном (40 мкМ).

а, б — серийные срезы одной клетки. Стрелкой показано отпочковывание ядра (Я). М — митохондрии, показаны стрелками; ЛВ — липидные включения.

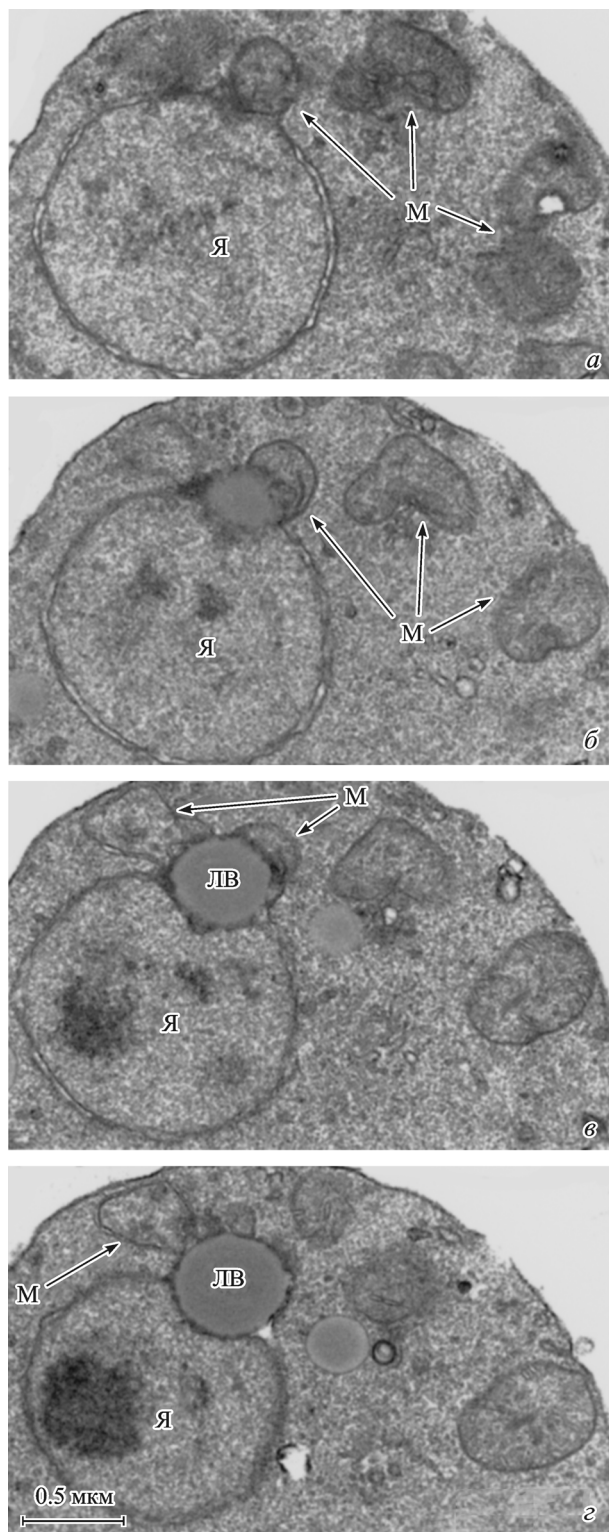


Рис. 5. Ультраструктура клеток мутанта *Dusp2 Saccharomyces cerevisiae* при кратковременной инкубации с амиодароном (40 мкМ) в течение 2—5 мин.

а—с — серийные срезы мутантной клетки. Липидное включение (ЛВ) контактирует с ядром (Я) и с митохондриями (М, показано стрелками). Ядро также содержит конденсированный хроматин.

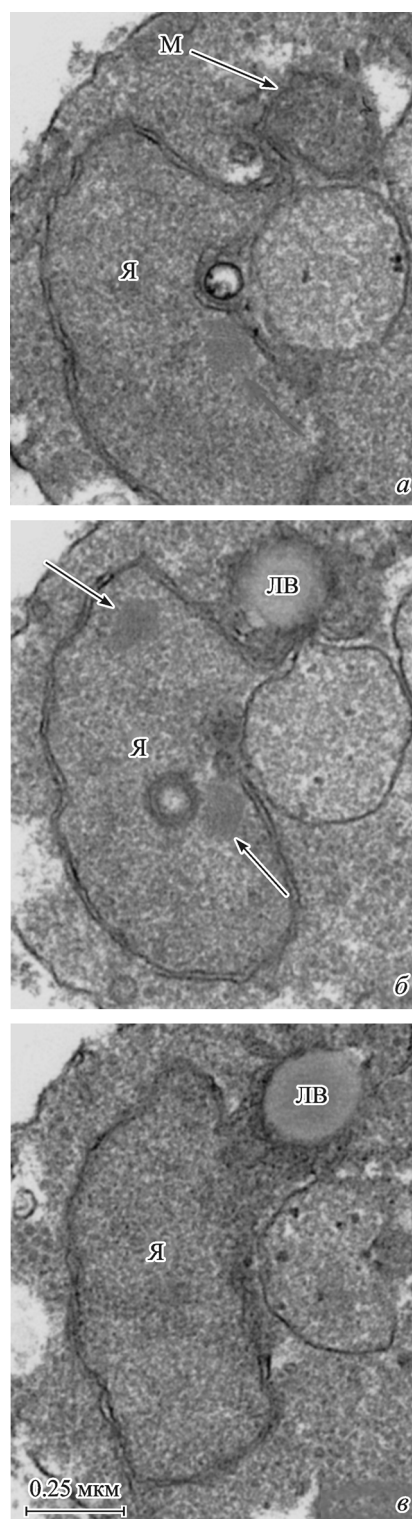


Рис. 6. Ультраструктура клеток мутанта *Dusp2 Saccharomyces cerevisiae* при кратковременной инкубации с амиодароном (40 мкМ) в течение 2—5 мин.

а—в — серийные срезы мутантной клетки. Липидное включение (ЛВ) контактирует с митохондрией (М, показано стрелками). В ядре присутствуют мембранные образования (стрелки).

ными и менее выраженными. На рис. 5 и 6 представлены последовательные срезы клеток, мутантных по гену *usp2*, инкубированные с амиодароном в таких же условиях. В ядре наблюдается маргинализация хроматина (рис. 5). В отдельных клетках также можно видеть нарушение целостности ядра с отпочковыванием фрагментов (рис. 6). Кроме этого, в клетках, мутантных по гену *usp2*, мы наблюдали появление в строме ядра мембранных образований — замкнутых кольцевидных структур и свободно лежащих стопок мембран (рис. 6, стрелки). Митохондрии незначительно набухшие и также ассоциированы с ЛВ, которые плотно прилегают к ядру, образуя тройной комплекс ядро—ЛВ—митохондрия. Однако ЛВ хотя и многочисленны, но мелкие и не достигают таких размеров, как в клетках дикого типа.

### Обсуждение

Наши исследования ультраструктуры клеток *S. cerevisiae* (дикий тип, мутант по гену *usp2*) при действии амиодарона выявили характерные ультраструктурные признаки развития процесса апоптоза, хорошо известные для клеток млекопитающих, но не описанные для этого вида дрожжевых клеток: маргинализацию хроматина, распад ядра с отпочковыванием его участков. Присутствие в клетках только мелких митохондрий также может свидетельствовать о фрагментации митохондрий — характерном признаке развития апоптоза.

Большой интерес вызывает обнаруженная нами пространственная реорганизация клеток *S. cerevisiae*, обусловленная повышением уровня содержания ЛВ под действием амиодарона. Подобные изменения ультраструктуры дрожжевых клеток в литературе неизвестны. Согласно литературным данным, амиодарон приводит к развитию фосфолипидоза — накоплению фосфолипидов (Pirovino et al., 1988). Показано, что в результате применения амиодарона или его производных (деэтиламиодарона или диэтиламиноэтоксигексестрола) в различных тканях животных — альвеолярных макрофагах, легких и печени — происходит накопление фосфолипидов (De la Iglesia et al., 1975; Kannan et al., 1989). В экспериментах на клетках бычьего эндотелия легочной артерии показано, что амиодарон вызывает значительное повышение уровня фосфолипидов (фосфатидилинозитола, фосфатидной кислоты и бис(моноацилглицерол)фосфата), специфически частично ингибируя их деградацию. Предполагается, что амиодарон является потенциальным ингибитором лизосомных фосфолипаз A<sub>1</sub> и A<sub>2</sub> (Martin et al., 1989).

ЛВ — одна из ключевых органелл липидного обмена клетки. ЛВ состоят из сильно гидрофобного ядра, содержащего нейтральные липиды (триацилглицерин и сложные эфиры), и поверхностного слоя полярных молекул (Leber et al., 1994). ЛВ дрожжей *S. cerevisiae* содержат два фермента, которые поэтапно ацилируют глицерол-3-фосфат до фосфатидной кислоты, ключевого интермедиата в биосинтезе липидов (Athenstaedt, Daum, 1997). При возрастании количества триацилглицерина в клетке происходят увеличение количества и размеров ЛВ, их скопление и затем агрегирование в общие кластеры (Brasaemle, 2007). Как известно, контакты между различными органеллами клетки являются важным компонентом внутриклеточных процессов (Bolt et al., 2001; Perktold et al., 2007). По литературным данным, наибольшее число взаимодействий наблюдается в парах ЛВ—ядро, ЛВ—ваку-

оль, ЭР—плазматическая мембрана и вакуоль—ядро. Предполагается, что липидный состав мембран — естественный регулятор контактирования между органеллами (Gaigg et al., 1995; Achleitner et al., 1999; Perktold et al., 2007). Обнаруженное нами значительное число клеток, показывающих картину контактирования митохондрий, ядра и ЛВ, указывает на возможную роль такого объединения — активную миграцию липидов между органеллами в условиях фосфолипидоза, возникающего при действии амиодарона (Gaigg et al., 1995; Achleitner et al., 1999; Perktold et al., 2007).

Резюмируя полученные нами и литературные данные, можно предположить, что амиодарон в клетках дрожжей *S. cerevisiae* запускает программу клеточной гибели, морфологические признаки которой были обнаружены в наших экспериментах: нарушение пространственной организации митохондриального ретикула, концентрация мелких митохондрий в зоне ядра, маргинализация хроматина и фрагментация ядра с последующим его распадом. Помимо этого, был обнаружен выраженный эффект одновременного взаимодействия ЛВ с ядром и митохондриями клетки — образование тройного комплекса. Возможным объяснением такой перестройки пространственной организации клетки является процесс фосфолипидоза, запускаемый амиодароном и приводящий к нарушению естественного метаболизма фосфолипидов.

### Список литературы

- Achleitner G., Gaigg B., Krasser A., Kainersdorfer E., Kohlwein S.D., Perktold A., Zellnig G., Daum G. 1999. Association between the endoplasmic reticulum and mitochondria of yeast facilitates interorganelle transport of phospholipids through membrane contact. *Eur. J. Biochem.* 264 : 545—553.
- Athenstaedt K., Daum G. 1997. Biosynthesis of phosphatidic acid in lipid particles and endoplasmic reticulum of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* 179 : 7611—7616.
- Bolt M. W., Card J. W., Racz W. J., Brien J. F., Massey T. E. 2001. Disruption of mitochondrial function and cellular ATP levels by amiodarone and N-desethylamiodarone in initiation of amiodarone-induced pulmonary cytotoxicity. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 298 : 1280—1289.
- Brasaemle D. L. 2007. Thematic review series: adipocyte biology. The perilipin family of structural lipid droplet proteins: stabilization of lipid droplets and control of lipolysis. *J. Lipid. Res.* 48 : 2547—2559.
- Campbell C. L., Tanaka N., White K. H., Thorsness P. E. 1994. Mitochondrial morphological and functional defects in yeast caused by *yme1* are suppressed by mutation of a 26S protease subunit homologue. *Mol. Biol. Cell.* 5 : 899—905.
- Dake M. D., Madison J. M., Montgomery C. K., Shellito J. E., Hinchcliffe W. A., Winkler M. L., Bainton D. F. 1985. Electron microscopic demonstration of lysosomal inclusion bodies in lung liver, lymph nodes, and blood leukocytes of patients with amiodarone pulmonary toxicity. *Amer. J. Med.* 78 : 506—512.
- De la Iglesia F. A., Feuer G., McGuire E. J., Takada A. 1975. Morphological and biochemical changes in the liver of various species in experimental phospholipidosis after diethylaminoethoxyhexestrol treatment. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 34 : 28—44.
- Fromenty B., Fisch C., Berson A., Letteron P., Larrey D., Pessegue D. 1990. Dual effect of amiodarone on mitochondrial respiration. Initial protonophoric uncoupling effect followed by inhibition of the respiratory chain at the levels of complex I and complex II. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 255 : 1377—1384.
- Gaigg B., Simbeni R., Hrstnik C., Paltauf F., Daum G. 1995. Characterization of a microsomal subfraction associated with mitochondria of the yeast, *Saccharomyces cerevisiae*. Involvement in

synthesis and import of phospholipids into mitochondria. *Biochim. biophys. acta.* 1234 : 214—220.

Gross S. A., Somani P. 1986. Amiodarone-induced ultrastructural changes in canine myocardial fibers. *Amer. Heart. J.* 112 : 771—779.

Gupta S. S., Ton V. K., Beaudry V., Rulli S., Cunningham K., Rao R. 2003. Antifungal activity of amiodarone is mediated by disruption of calcium homeostasis. *J. Biol. Chem.* 278 : 28 831—28 839.

Heger J. J., Prystowsky E. N., Jackman W. M., Naccarelli G. V., Warfel K. A., Rinkenberger R. L., Zipes D. P. 1981. Clinical efficacy and electrophysiology during long-term therapy for recurrent ventricular tachycardia or ventricular fibrillation. *N. Engl. J. Med.* 305 : 539—545.

Kannan R., Sarma J. S., Guha M., Venkataraman K. 1989. Tissue drug accumulation and ultrastructural changes during amiodarone administration in rats. *Fundam. Appl. Toxicol.* 13 : 793—803.

Knorre D. A., Ojovan S. M., Saprunova V. B., Sokolov S. S., Bakeeva L. E., Severin F. F. 2008. Mitochondrial matrix fragmentation as a protection mechanism of yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochemistry (Mosc.)*. 73 : 1254—1259.

Leber R., Zinser E., Zellnig G., Paltauf F., Daum G. 1994. Characterization of lipid particles of the yeast, *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*. 10 : 1421—1428.

Martin W. J., Kachel D. L., Vilen T., Natarajan V. 1989. Mechanism of phospholipidosis in amiodarone pulmonary toxicity. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 251 : 272—278.

Perktold A., Zechmann B., Daum G., Zellnig G. 2007. Organelle association visualized by three-dimensional ultrastructural imaging of the yeast cell. *FEMS Yeast Res.* 7 : 629—638.

Pirovino M., Muller O., Zysset T., Honegger U. 1988. Amiodarone-induced hepatic phospholipidosis: correlation of morphological and biochemical findings in an animal model. *Hepatology*. 8 : 591—598.

Pozniakovsky A. I., Knorre D. A., Markova O. V., Hyman A. A., Skulachev V. P., Severin F. F. 2005. Role of mitochondria in the pheromone- and amiodarone-induced programmed death of yeast. *J. Cell. Biol.* 168 : 257—269.

Reynolds E. S. 1963. The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. *J. Cell Biol.* 17 : 208—213.

Sherman F. 2002. Getting started with yeast. *Methods Enzymol.* 350 : 3—41.

Singh B. N. 1996. Antiarrhythmic actions of amiodarone: a profile of a paradoxical agent. *Amer. J. Cardiol.* 78 : 41—53.

Somani P., Bandyopadhyay S., Gross S. A., Morady F., Dicarlo L. A. 1987. Amiodarone and multilamellar inclusion bodies. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 24 : 237—239.

Yang H., Ren Q., Zhang Z. 2006. Chromosome or chromatin condensation leads to meiosis or apoptosis in stationary yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) cells. *FEMS Yeast Res.* 6 : 1254—1263.

Yasuda S. U., Sausville E. A., Hutchins J. B., Kennedy T., Woosley R. L. 1996. Amiodarone-induced lymphocyte toxicity and mitochondrial function. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 28 : 94—100.

Zhang Y. Q., Rao R. 2007. Global disruption of cell cycle progression and nutrient response by the antifungal agent amiodarone. *J. Biol. Chem.* 282 : 37 844—37 853.

Поступила 23 III 2009

#### YEAST CELL ULTRASTRUCTURE AFTER AMIODARONE TREATMENT

S. M. Ojovan,<sup>1, 2</sup> D. A. Knorre,<sup>2</sup> F. F. Severin,<sup>2</sup> L. E. Bakeeva<sup>2, \*</sup>

<sup>1</sup> Faculty of Bioengineering and Bioinformatics, M. V. Lomonosov Moscow State University, and <sup>2</sup> A. N. Belozersky Physical-Chemical Biology Institute M. V. Lomonosov Moscow State University, and  
\* e-mail: bakeeva@imec.msu.ru

Amiodarone is used as a pharmaceutical substance for treating a number of diseases. However it is known that structural and functional disturbances are caused by amiodarone in patient's tissues. Here particular features of amiodarone effect are studied in yeast *Saccharomyces cerevisiae*, where amiodarone was shown to cause apoptosis. Electron-microscopic study of yeast cells after amiodarone treatment reveals a significant increase in lipid particle number which can lead to formation of a structural complex by interacting with membranous organelles of a cell. Amiodarone causes the appearance of small and separated slightly swollen mitochondria. Chromatin displacement to the periphery of nucleus, nuclear sectioning and nuclear envelope disturbances are observed in the cells under these conditions. The detected cell ultrastructure alterations in the *S. cerevisiae* are considered to be specific response to the phospholipidosis and apoptosis caused by amiodarone.

**Key words:** yeast *Saccharomyces cerevisiae*, apoptosis, phospholipidosis, cell ultrastructure, lipid particles (LP), amiodarone.