

ДОКСОРУБИЦИН И МЕНАДИОН ВЫЗЫВАЮТ ЗАДЕРЖКУ КЛЕТОЧНОЙ ПРОЛИФЕРАЦИИ *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* С ПОМОЩЬЮ РАЗЛИЧНЫХ МЕХАНИЗМОВ

© Ю. В. Саенко, А. М. Шутлов, Е. В. Рассторгуева

Ульяновский государственный университет;
электронный адрес: saenkojv@yandex.ru

Проведена сравнительная оценка влияния доксорубина и менадиона на клеточную пролиферацию, распределение клеток по фазам клеточного цикла, концентрацию глутатиона, экспрессию рибонуклеотидредуктазы и активность Yap1-зависимых редокс-чувствительных путей с использованием эукариотической клеточной модели *Saccharomyces cerevisiae*. Выяснено, что в присутствии менадиона происходит задержка клеточного цикла в G₁-фазе, снижается концентрация GSH, увеличивается количество GSSG, зависимо от концентрации возрастают экспрессия рибонуклеотидредуктазы и активность Yap1-сигнальных путей. Доксорубин приводит к задержке клеточного цикла в G₁- и S-фазах, вызывает увеличение концентрации GSH и GSSG, увеличивает экспрессию рибонуклеотидредуктазы и изменяет активность Yap1-зависимых сигнальных путей.

Ключевые слова: доксорубин, менадион, клеточный цикл, рибонуклеотидредуктаза, Yap1.

Принятые сокращения: GSH — глутатион восстановленный, GSSG — глутатион окисленный, *LacZ* — ген β-галактозидазы, *RNR3* — ген рибонуклеотидредуктазы III, Yap1 — фактор транскрипции, *YRE* — респонсивный элемент фактора транскрипции Yap1.

Доксорубин и менадион относятся к хинонам. Они легко проникают через клеточные мембраны и могут долго удерживаться внутри клетки. Их влияние на клетку заключается в способности вызывать оксидативный стресс через влияние на внутриклеточный окислительно-восстановительный потенциал и образовывать молекулярные и ковалентные соединения с ионами металлов, белками и ДНК. Основным механизмом, приводящим к возникновению оксидативного стресса, являются редокс-циклические реакции превращения хинона в семихинон, что ведет к образованию активных производных кислорода, таких как супероксид-анион-радикал, пероксид водорода и гидроксильный радикал (Shackelford et al., 2000; Minotti et al., 2004). Эти молекулы в свою очередь могут быть ответственны за свободнорадикальное повреждение ДНК и замедление клеточной пролиферации (Schafer, Buettner, 2001; Dröge, 2002; Shapira et al., 2004). Помимо редокс-циклических реакций хиноны могут образовывать ковалентные соединения с различными внутриклеточными молекулами, особенно это касается доксорубина. Так, доксорубин может ингибировать ДНК-топоизомеразу и ряд ферментов гомеостаза железа. Ингибирование ДНК-топоизомеразы само по себе может служить причиной задержки пролиферации (Minotti et al., 2004). Вместе с тем продемонстрирована способность менадиона влиять на клеточную пролиферацию только через индукцию оксидативного стресса (Yamamoto et al., 2007).

Таким образом, механизмы влияния на клеточную пролиферацию доксорубина и менадиона включают инициацию оксидативного стресса и ингибирование ключевых ферментных систем. Можно предположить, что ме-

ханизмы задержки клеточной пролиферации будут похожи у доксорубина и менадиона только в случае ведущей роли оксидативного стресса в этих процессах.

Одним из основных механизмов регуляции клеточной пролиферации является контроль синтеза дезоксирибонуклеотидов. Ключевым ферментом этого анаболического пути является фермент S-фазы клеточного цикла — рибонуклеотидредуктаза, которая восстанавливает рибозу до дезоксирибозы (Hashemy et al., 2006). В качестве донора водорода рибонуклеотидредуктаза использует тиоредоксин, который в этой реакции окисляется и потом восстанавливается ферментом тиоредоксинредуктазой, использующей в качестве доноров водорода НАДФН₂. Мутантные штаммы, недостаточные по генам *TRX1* и *TRX2*, плохо растут и характеризуются пролонгированной S-фазой. Такой эффект связан с задержкой в образовании дезоксирибонуклеотидов и невозможностью синтеза ДНК (Kos et al., 2006). Гены тиоредоксина находятся под контролем редокс-чувствительного фактора транскрипции Yap1 и обычно активируются в ответ на возникновение внутриклеточного оксидативного стресса (Delaunay et al., 2002; Moye-Rowley, 2003; Калинина и др., 2007).

Изучение внутриклеточных процессов эукариотических клеток сопровождается рядом трудностей, связанных с наличием широкомасштабной межклеточной коммуникации, которая оказывает существенное влияние на течение внутриклеточных процессов. В этой связи удобной моделью для изучения внутриклеточных сигнальных механизмов являются одноклеточные эукариотические организмы — *Saccharomyces cerevisiae*. Это связано с тем, что многие внутриклеточные метаболические, генетические и сигнальные

механизмы в общих чертах схожи у большинства эукариотических клеток различных видов. Кроме этого, дрожжи уже успешно использовались для изучения токсических эффектов лекарственных средств, в том числе и антрацилиновых антибиотиков (Buschini et al., 2003).

Целью настоящей работы является изучение механизмов задержки клеточной пролиферации под влиянием доксорубина и менадиона. Мы оценили влияние этих веществ на клеточную пролиферацию, распределение клеток по фазам клеточного цикла, концентрацию окисленного и восстановленного глутатиона, экспрессию рибонуклеотидредуктазы и активность Yap1-зависимых редокс-чувствительных путей с использованием эукариотической клеточной модели на основе *S. cerevisiae*.

Материал и методика

Использовали штамм YPH499 (MET α , *ura3-52*, *lys2-801*, *ade2-101*, *trp1- Δ 63*, *his3- Δ 200* и *leu2- Δ 1*). Плазмида pZZ2 (YCp, *URA3* и *RNR3-LacZ*), содержащая промотор гена *RNR3*, сцепленный с геном β -галактозидазы, получена от д-ра С. Эледжа (Центр геномики и протеомики, Гарвардская школа медицины, Бостон, США) (Elledge, Davis, 1990). Плазмида pCLZ-314 (*TRP1* и *YRE-LacZ*), содержащая Yap1-респонсивный элемент (*YRE*) гена тиоредоксина, сцепленный с геном β -галактозидазы, получена от д-ра В. Скотта Моу-Ройли (кафедра физиологии и биофизиологии, Университет Айовы, США) (Colleman et al., 1999).

Инкубацию клеток с различными концентрациями доксорубина и менадиона проводили в течение 24 ч при 25 °С в минимальной синтетической среде без урацила. Проводили минимум 5 опытов с одной и той же концентрацией вещества. Инкубацию осуществляли на качалке (250 об/мин) в круглодонных колбах объемом 250 мл, объем среды — 30 мл. Начальная концентрация клеток во всех опытах была одинаковой и составляла OD₆₀₀ = 0.15. Степень клеточной пролиферации оценивали посредством измерения оптической плотности клеток при 600 нм (OD₆₀₀).

Определение активности β -галактозидазы проводили с использованием 2-нитрофенил- β -D-галактопиранозид (ONPG) в качестве субстрата (Elledge, Davis, 1990). Для определения концентрации восстановленного глутатиона (GSH) использовали 5',5'-дитиобис-2-нитробензойную кислоту (ДНТБ). Окисленный глутатион (GSSG) вначале восстанавливали глутатионредуктазой до GSH, а затем определяли в реакции с ДНТБ. Концентрацию GSSG определяли по разнице между суммарной концентрацией GSH и GSSG и концентрацией GSH. Количество GSH и GSSG выражали в мкМ на 10⁷ клеток (Aytac et al., 2001).

Фазы клеточного цикла подсчитывали в поле зрения светового микроскопа. К G₁-фазе относили одиночные клетки; к S-фазе относили клетки в фазе почкования, в случае если объем дочерней клетки был не более 50 % от объема материнской клетки; к фазе G₂/M₀ относили клетки, у которых объем дочерней клетки составлял более 50 % объема материнской клетки (Alic et al., 2001). Результаты обработаны статистически с использованием *t*-критерия Стьюдента для парных переменных. Показатели представлены как M \pm SD. Различия между группами считали достоверными при *P* < 0.05.

Использованные реактивы: глутатионредуктаза, 5',5'-дитиобис-2-нитробензойная кислота, 2-нитрофенил- β -D-галактопиранозид (Sigma-Aldrich, США); доксорубин гидрохлорид (ТЕВА Фармацевтические предприятия Лтд., Израиль); менадион (ICN Biomedicals Inc.).

Результаты

В наших экспериментах доксорубин и менадион вызывали зависимое от дозы снижение темпов клеточной пролиферации. Из данных таблицы видно, что антипролиферативный эффект менадиона при сопоставимых концентрациях был немного выше, чем у доксорубина. Однако эти два вещества по-разному влияли на клеточный цикл. На рис. 1 представлено разделение клеток по фазам клеточного цикла в норме и в присутствии 50 мкМ доксорубина или 50 мкМ менадиона. Как видно на рис. 1, в присутствии менадиона количество клеток в G₁-фазе было достоверно выше, чем в контроле; количество клеток в S- и G₂/M₀-фазах было сопоставимо с контролем. В присутствии доксорубина наблюдали достоверное увеличение количества клеток, находящихся в G₁- и S-фазах, и снижение количества клеток, находящихся в G₂/M₀-фазе в сравнении с контролем.

Как видно на рис. 2, доксорубин вызывал рост концентрации GSH на 25—45 %. Одновременно с ростом концентрации GSH отмечали рост концентрации GSSG на 80—280 %. При концентрации доксорубина 30 мкМ и более количество общего глутатиона (GSH и GSSG) не изменялось (рис. 2). Менадион приводил к снижению концентрации GSH в среднем на 15 %. Присутствие менадиона в ростовой среде приводило к увеличению внутриклеточного содержания GSSG на 15—40 %. Таким образом, доксорубин вызывал увеличение внутриклеточного содержания GSH и GSSG, тогда как менадион приводил к снижению концентрации GSH и увеличению внутриклеточного количества GSSG.

Влияние доксорубина и менадиона на экспрессию рибонуклеотидредуктазы и активность Yap1-зависимых

Влияние доксорубина и менадиона в различных концентрациях в ростовой среде на клеточную пролиферацию

Агент	Пролиферация (в %) при разной концентрации агента, мкМ					
	0 (контроль)	10	20	30	40	50
Доксорубин	100.0 \pm 0.73	98.16 \pm 1.27 ^a	95.16 \pm 2.29 ^b	89.67 \pm 1.53 ^b	88.54 \pm 1.53 ^b	87.44 \pm 2.44 ^b
Менадион	100.0 \pm 0.54	98.11 \pm 2.84	96.01 \pm 2.33 ^b	89.63 \pm 2.39 ^b	85.06 \pm 1.19 ^b	82.86 \pm 0.61 ^b

Примечание. Пролиферацию оценивали через 24 ч инкубации путем измерения оптической плотности клеточных культур при 600 нм. Оптическую плотность без добавления препаратов принимали равной 100 %. ^a*P* < 0.05, ^b*P* < 0.01, ^в*P* < 0.001 по сравнению с контролем.

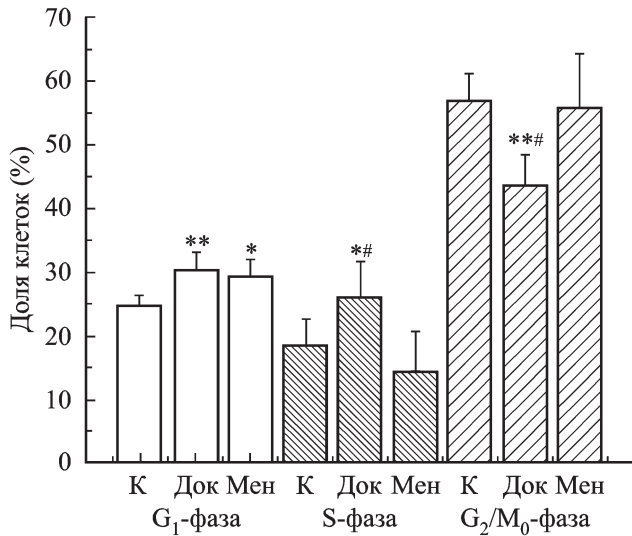


Рис. 1. Влияние доксорубина (Док) и менадиона (Мен) в концентрации 50 мкМ на распределение клеток по фазам клеточного цикла.

К — контроль; * — $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ (в сравнении с контрольной группой); # $P < 0.05$ (в сравнении с группой менадион).

сигнальных механизмов мы оценивали с использованием репортерных генетических конструкций *RNR3-LacZ* и *YRE-LacZ*. В этих конструкциях промотор гена большой субъединицы рибонуклеотидредуктазы-3 (*RNR3*) и Yар1-респонсивный элемент гена тиоредоксина (*YRE*) сцеплены с ферментом β-галактозидазой, что дает возможность по величине активности β-галактозидазы судить об экспрессии генов рибонуклеотидредуктазы-3 и активности фактора транскрипции Yар и, следовательно, косвенно — об экспрессии генов, содержащих Yар1-респонсивный элемент (Elledge, Davis, 1990; Colleman et al., 1999; Buschini et al., 2003).

На рис. 3 графически представлено изменение экспрессии репортерных генетических конструкций *RNR3-*

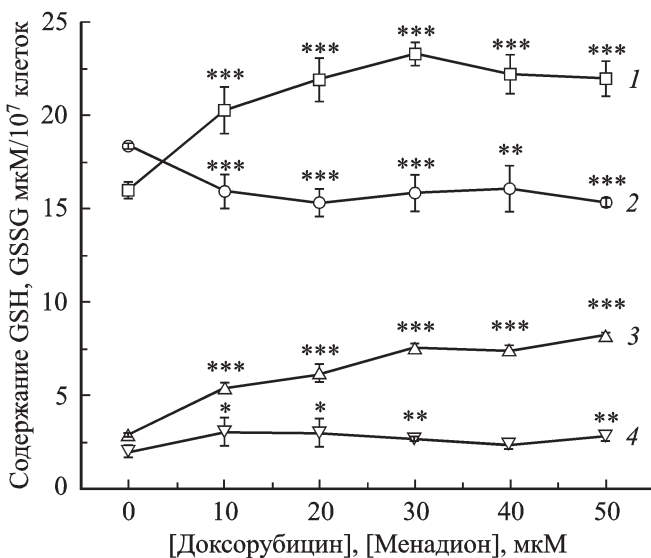


Рис. 2. Содержание GSH (1, 2) и GSSG (3, 4) в клетках *Saccharomyces cerevisiae*, инкубированных в среде с разной концентрацией доксорубина (1, 3) и менадиона (2, 4).

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

LacZ и *YRE-LacZ* в присутствии менадиона и доксорубина. В ответ на увеличение концентрации этих веществ в ростовой среде наблюдали достоверное увеличение экспрессии *RNR3-LacZ* и *YRE-LacZ* при всех изученных концентрациях, о чем свидетельствует увеличение активности β-галактозидазы (рис. 3). Экспрессия *RNR3-LacZ* зависела от концентрации обоих веществ и увеличивалась с ростом их концентрации в среде. Характер экспрессии *YRE-LacZ* различался для доксорубина и менадиона. Так, в присутствии доксорубина экспрессия *YRE-LacZ* слабо зависела от его концентрации; наибольшую активность β-галактозидазы и соответственно наибольшую экспрессию *YRE-LacZ* наблюдали при концентрации доксорубина в ростовой среде, равной 20 мкМ, в дальнейшем при увеличении концентрации доксорубина активность этой генетической конструкции снижалась. В случае менадиона величина экспрессии *YRE-LacZ* возрастала и зависела от концентрации этого вещества в ростовой среде. Как видно на рис. 3, в присутствии доксорубина не наблюдали синхронных изменений экспрессии *RNR3-LacZ* и *YRE-LacZ*, тогда как в присутствии менадиона активность репортерных генетических конструкций *RNR3-LacZ* и *YRE-LacZ* изменялась синхронно и увеличивалась с ростом концентрации.

Обсуждение

В нашей работе мы сравнили влияние доксорубина и менадиона на механизмы клеточной пролиферации. Доксорубин и менадион вызывают снижение темпов клеточной пролиферации в одинаковой степени (см. таблицу), но по-разному влияют на клеточный цикл (рис. 1). Менадион приводит к пролонгации G₁-фазы клеточного цикла (рис. 1), что согласуется с данными работ других авторов (Shapira et al., 2004). Доксорубин вызывает увеличение количества клеток, находящихся в G₁- и S-фазах. Различие между доксорубином и менадином заключается в том, что доксорубин дополнительно приводит

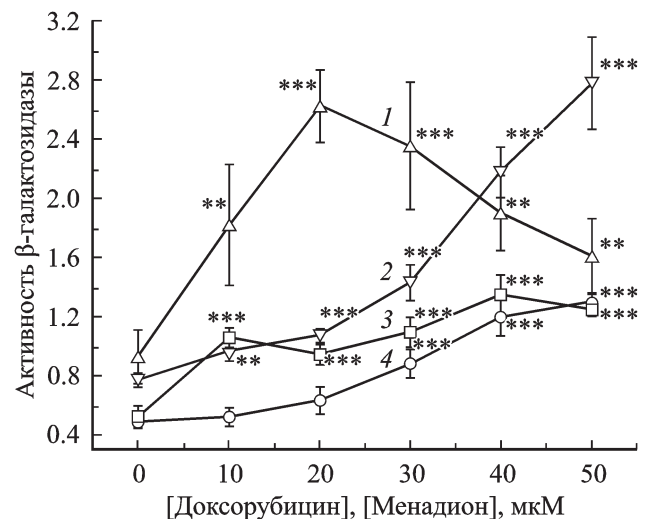


Рис. 3. Величина экспрессии репортерных генетических конструкций *RNR3-LacZ* (1, 2) и *YRE-LacZ* (3, 4), выраженных через активность β-галактозидазы, в клетках *Saccharomyces cerevisiae*, инкубированных в среде, содержащей доксорубин (1, 3) или менадион (2, 4) в различных концентрациях.

Активность β-галактозидазы выражена в мкМ 2-нитрофенила, образовавшегося за 1 мин в 1 мл среды, содержащей 10⁷ клеток. ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ по сравнению с контролем.

к пролонгации клеточного цикла в S-фазе. В большинстве работ отмечают, что доксорубин вызывает пролонгацию G₂-фазы, и связывают это с ингибированием ДНК-топоизомеразы II (Hutter et al., 1997; Aytac et al., 2001; Minotti et al., 2004). В литературе также появлялись данные о том, что доксорубин может вызывать задержку как в G₁-, так и в G₂-фазах (Hutter et al., 1997).

Такое расхождение с нашими данными мы связываем, во-первых, с тем, что задержка в G₂-фазе была обнаружена в раковых клетках, тогда как наша модель ближе к нормальному клеточному циклу эукариотических клеток; а во-вторых, с тем, что эксперименты выполняли на синхронизированных клетках в S-фазе (Ling et al., 1996). К этому можно добавить, что в большинстве работ оценивается повреждение ДНК доксорубином, максимум которого приходится на G₂-фазу (Potter et al., 2002; Minotti et al., 2004), но хотя повреждение ДНК и задержка пролиферации и могут быть связаны между собой, они не являются идентичными механизмами.

В литературе интенсивно обсуждается взаимосвязь внутриклеточного окислительно-восстановительного потенциала с длительностью фаз клеточного цикла (Hutter et al., 1997; Menon et al., 2003). Основной вклад в формирование внутриклеточного окислительно-восстановительного потенциала делает пара GSH/GSSG (Schafer, Buettner, 2001). Мы выявили различие между менадионом и доксорубином в их способности влиять на внутриклеточную концентрацию GSH и GSSG (рис. 2). Менадион приводит к снижению концентрации GSH и незначительному увеличению концентрации GSSG, тогда как доксорубин вызывает увеличение концентрации как GSH, так и GSSG. Сам факт увеличения концентрации GSH и GSSG в присутствии доксорубина требует более детального изучения (Саенко, Шутов, 2007).

Менадион вызывает снижение концентрации GSH и незначительное увеличение концентрации GSSG, что согласуется с ранее полученными данными (Mutoh et al., 2005). Незначительный рост концентрации GSSG и снижение количества GSH в случае менадиона можно объяснить особенностями метаболизма этого соединения (Gotoh et al., 2002; Mauzeroll, Bard, 2004).

Нормальное течение клеточного цикла связано с доступностью дезоксирибонуклеотидов; этот процесс, в частности, находится под контролем рибонуклеотидредуктазы и тиоредоксина (Hashemy et al., 2006). В свою очередь тиоредоксин и связанные с ним метаболические пути у *S. cerevisiae* находятся под контролем фактора транскрипции Yap-1 (Coleman et al., 1999; Delaunay et al., 2002; Moye-Rowley, 2003). В наших экспериментах доксорубин и менадион одинаково влияли на экспрессию репортерной генетической конструкции *RNR3-LacZ*, по которой мы могли судить об экспрессии рибонуклеотидредуктазы (рис. 3). Однако причины увеличения экспрессии *RNR3-LacZ* в присутствии менадиона и доксорубина, по нашему мнению, различны. В случае менадиона это связано с повреждением ДНК свободнорадикальными молекулами (Elledge, Davis, 1990); в пользу этого свидетельствует факт накопления GSSG и снижение GSH, что говорит о возникновении оксидативного стресса.

Такое объяснение частично может быть справедливо и для доксорубина. Но может существовать и другое объяснение. В состав рибонуклеотидредуктазы помимо большой субъединицы, кодируемой генами *RNR1* и *RNR3*, входит также и малая субъединица (Stubbe et al., 2001), которая содержит кофактор, состоящий из тирозильного

радикала, сцепленного с двумя атомами железа. Известно, что доксорубин оказывает существенное влияние на внутриклеточный метаболизм железа (Kotamraju et al., 2002), что может послужить причиной увеличения экспрессии генов рибонуклеотидредуктазы через влияние на активность ее малой субъединицы. Пролонгирование S-фазы в присутствии доксорубина может косвенно свидетельствовать в пользу этого предположения, поскольку именно дисрегуляция синтеза дезоксирибонуклеотидов может быть одной из причин такой задержки (Chabes, Thelander, 2000; Кос et al., 2006).

Активность конструкции *YRE-LacZ* различалась в присутствии доксорубина и менадиона. В присутствии менадиона экспрессия *YRE-LacZ* увеличивалась пропорционально увеличению концентрации этого вещества в ростовой среде, что согласуется с данными других работ, в которых также отмечалась активация как тиоредоксина, так и фактора Yap-1 в присутствии менадиона (Yamamoto et al., 2007). Отсутствие корреляции между активностью *YRE-LacZ* и концентрацией GSSG, вероятно, связано с тем, что менадион выводится из клетки в качестве конъюгата с глутатионом (Mauzeroll, Bard, 2004), поэтому, несмотря на увеличение активности *YRE-LacZ*, концентрация GSH падает, а GSSG слабо возрастает или не изменяется.

В присутствии доксорубина экспрессия *YRE-LacZ* вначале возрастает, а затем начинает снижаться (рис. 3). Такая пиковая активность фактора Yap-1 в присутствии доксорубина, по нашему мнению, связана с увеличением концентрации GSH. Фактор Yap-1 относится к группе редокс-чувствительных факторов транскрипции (Izawa et al., 1999; Dröge, 2002). Доксорубин, с одной стороны, участвуя в редокс-циклических реакциях, вызывает образование свободных радикалов и тем самым активирует Yap-1 (Hutter et al., 1997; Калинина и др., 2006). С другой стороны, пока не вполне понятным причинам доксорубин увеличивает концентрацию GSH, что приводит к увеличению редокс-потенциала (Schafer, Buettner, 2001) и инактивации фактора Yap-1.

Таким образом, доксорубин и менадион снижают темпы клеточной пролиферации различными механизмами. Менадион путем участия в редокс-циклических реакциях вызывает увеличение количества свободнорадикальных молекул и индукцию оксидативного стресса, что проявляется в снижении концентрации GSH. Оксидативный стресс вызывает повреждения ДНК, увеличивает экспрессию рибонуклеотидредуктазы и Yap-1-зависимых генов. Недостаток GSH и отвлечение энергетических ресурсов клетки на борьбу с оксидативным стрессом и детоксикацию менадиона в итоге вызывают задержку клеточного цикла в G₁-фазе. Влияние доксорубина на клеточный цикл похоже, но вместе с этим существуют и принципиальные различия. Подобно менадиону доксорубин индуцирует оксидативный стресс, и это вызывает пролонгацию G₁-фазы. Но вместе с этим доксорубин по непонятным пока причинам вызывает рост концентрации GSH в клетках *S. cerevisiae*, что, вероятно, связано с дисрегуляцией механизма синтеза дезоксирибозы, и это, по нашему мнению, является причиной задержки клеточного цикла в S-фазе.

Список литературы

Калинина Е. В., Чернов Н. Н., Саприн А. Н., Котова Я. Н., Андреев Я. А., Соломка В. С., Щербак Н. П. 2006. Изменение экспрессии генов антиоксидантных ферментов, гемоксигеназы-1, bcl-2, bcl-xl и уровня активных форм кислорода при фор-

мировании резистентности опухолевых клеток к доксорубину. Биохимия. 71 (11) : 1479—1487.

Калинина Е. В., Чернов Н. Н., Сапрын А. Н., Котова Я. Н., Гаврилова Ю. А., Черных Н. С., Щербак Н. П. 2007. Экспрессия генов тиоредоксина 1 и тиоредоксина 2 в клетках карциномы яичника SKVLB с мультилекарственной резистентностью. Бюлл. эксперим. биол. мед. 144 (9) : 274—277.

Саенко Ю. В., Шутов А. М. 2007. Изучение генотоксических свойств доксорубина с использованием клеточной модели *Saccharomyces cerevisiae*. Эксперим. клинич. фармакол. 70 (3) : 29—32.

Alic N., Higgins V. J., Dawes I. W. 2001. Identification of a *Saccharomyces cerevisiae* gene that is required for G₁ arrest in response to the lipid oxidation product linoleic acid hydroperoxide. Mol. Biol. Cell. 12 : 1801—1810.

Aytac U., Clare F.-X., Ho L., Seto K., Ohnuma K., Mills G. B., Cabanillas F., Morimoto C., Dang N. H. 2001. Expression of CD26 and its associated dipeptidyl peptidase IV enzyme activity enhances sensitivity to doxorubicin-induced cell cycle arrest at the G₂/M checkpoint. Cancer Res. 61 : 7204—7210.

Buschini A., Poli P., Rossi C. 2003. *Saccharomyces cerevisiae* as an eukaryotic cell model to assess cytotoxicity and genotoxicity of three anticancer anthraquinones. Mutagenesis. 18 : 25—36.

Chabes A., Thelander L. 2000. Controlled protein degradation regulates ribonucleotide reductase activity in proliferating mammalian cells during the normal cell cycle and in response to DNA damage and replication blocks. J. Biol. Chem. 275 : 17 747—17 753.

Colleman S. T., Epping E. A., Streggerda S. M., Moye-Rowley W. S. 1999. Yap1p activates gene transcription in an oxidant-specific fashion. Mol. Cell. Biol. 19 : 8302—8313.

Delaunay A., Pflieger D., Barrault M.-B., Vinh J., Toledano M. B. 2002. A thiol peroxidase is an H₂O₂ receptor and redox-transducer in gene activation. Cell. 111 : 471—481.

Dröge W. 2002. Free radicals in the physiological control of cell function. Physiol. Rev. 82 : 47—95.

Elledge S. J., Davis R. W. 1990. Two genes differentially regulated in the cell cycle and by DNA-damaging agents encode alternative regulatory subunits of ribonucleotide reductase. Genes Develop. 4 : 740—751.

Gotoh Y., Noda T., Iwakiri R., Fujimoto K., Rhoads C. A., Aw T. Y. 2002. Lipid peroxide-induced redox imbalance differentially mediates CaCo-2 cell proliferation and growth arrest. Cell Prolif. 35 : 221—235.

Hashemy S. L., Ungerstedt J. S., Avval F. Z., Holmgren A. 2006. Motexafin gadolinium, a tumor-selective drug targeting thioredoxin reductase and ribonucleotide reductase. J. Biol. Chem. 281 : 10 691—10 697.

Hutter D. E., Till B. G., Greene J. J. 1997. Redox state changes in density-dependent regulation of proliferation. Exp. Cell Res. 232 : 435—438.

Izawa S., Maeda K., Sugiyama K., Mano J., Inoue Y., Kimura A. 1999. Thioredoxin deficiency causes the constitutive activation

of Yap1, an AP-1-like transcription factor in *Saccharomyces cerevisiae*. J. Biol. Chem. 274 : 28 459—28 465.

Koc A., Methews C. K., Wheeler L. J., Gross M. K., Merrill G. F. 2006. Thioredoxin is required for deoxyribonucleotide pool maintenance during S phase. J. Biol. Chem. 281 : 15 058—15 063.

Kotamraju S., Chitambar C. R., Kalivendi S. V., Joseph J., Kalyanaraman B. 2002. Transferrin receptor-dependent iron uptake is responsible for doxorubicin-mediated apoptosis in endothelial cells. Role of oxidant-induced iron signaling in apoptosis. J. Biol. Chem. 277 : 17 179—17 187.

Ling Y. H., el-Naggar A. K., Priebe W., Perez-Soler R. 1996. Cell cycle-dependent cytotoxicity, G₂/M phase arrest, and disruption of p34cdc2/cyclin B1 activity induced by doxorubicin in synchronized P388 cells. Mol. Pharmacol. 49 : 832—841.

Mauzeroll J., Bard A. J. 2004. Scanning electrochemical microscopy of menadione-glutathione conjugate export from yeast cells. PNAS. 101 : 7862—7867.

Menon S. G., Sarsour E. H., Spitz D. R., Higashikubo R., Sturm M., Zhang H., Goswami P. C. 2003. Redox Regulation of the G₁ to S phase transition in the mouse embryo fibroblast cell cycle. Cancer Res. 63 : 2109—2117.

Minotti G., Menna P., Salvatorelli E., Cairo G., Gianni L. 2004. Anthracyclines: molecular advances and pharmacological developments in antitumor activity and cardiotoxicity. Pharmacol. Rev. 56 : 185—229.

Moye-Rowley W. S. 2003. Regulation of the transcriptional response to oxidative stress in fungi: similarities and differences. Eukaryotic Cell. 2 : 381—389.

Mutoh N., Kawabeta M., Kitajima S. 2005. Effects of four oxidants, menadione, 1-chloro-2, 4-dinitrobenzene, hydrogen peroxide and cumene hydroperoxide, on fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. J. Biochem. 138 : 797—804.

Potter A. J., Gollahon K. A., Palanca B. A., Harbert M. J., Choi Y. M., Moskovitz A. H., Potter J. D., Rabinovitch P. S. 2002. Flow cytometric analysis of the cell cycle phase specificity of DNA damage induced by radiation, hydrogen peroxide and doxorubicin. Carcinogenesis. 23 : 389—401.

Schafer F. Q., Buettner G. R. 2001. Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple. Free Radic. Biol. Med. 30 : 1191—1212.

Shackelford R. E., Kaufmann W. K., Paules R. S. 2000. Oxidative stress and cell cycle checkpoint function. Free Radic. Biol. Med. 28 : 1387—1404.

Shapira M., Segal E., Botstein D. 2004. Disruption of yeast forkhead-associated cell cycle transcription by oxidative stress. Mol. Biol. Cell. 15 : 5659—5669.

Stubbe J., Ge J., Yee C. S. 2001. The evolution of ribonucleotide reduction revisited. Trends Biochem. Sci. 26 : 93—99.

Yamamoto A., Ueda J., Yamamoto N., Hashikawa N., Sakurai H. 2007. Role of heat shock transcription factor in *Saccharomyces cerevisiae* oxidative stress response. Eukaryotic Cell. 6 : 1373—1379.

Поступила 31 VIII 2009

DOXORUBICIN AND MENADIONE REDUCE CELL PROLIFERATION OF *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* BY DIFFERENT MECHANISMS

Yu. V. Saenko, A. M. Shutov, E. V. Rastorgueva

Ulyanovsk State University; e-mail: saenkoyv@yandex.ru

The aim of this study was to determine the impacts of doxorubicin and menadion on cell proliferation, cell distribution in accordance with the phases of the cell-cycle phase, glutathione concentration, ribonucleotide reductase expression, and Yap1 dependent redox-sensitive pathway activity using *Saccharomyces cerevisiae* as eukaryote cell model. Our data show that menadione induced cell cycle arrest in G₁-phase, reduction of intracellular GSH, an increase in GSSG concentration, and dose-dependent increases in ribonucleotide reductase expression and the activity of Yap1 pathway. Doxorubicin induced cell cycle arrest in G₁- and S-phases, increased GSH and GSSG concentrations, increased expression of ribonucleotide reductase, and modulated Yap-dependent pathway activity.

Key words: doxorubicin, menadione, ribonucleotide reductase, cell cycle, Yap1.