

*На правах рукописи*

**Смирнова Светлана Владимировна**

**ВЛИЯНИЕ ДЕЙТЕРИЯ НА ГЕНОТОКСИЧЕСКИЕ ЭФФЕКТЫ ХИМИЧЕСКИХ  
СОЕДИНЕНИЙ В КЛЕТКАХ *ESCHERICHIA COLI***

1.5.7 – генетика (биологические науки)

**АВТОРЕФЕРАТ**

диссертации на соискание учёной степени

кандидата биологических наук

Москва, 2023

Работа выполнена в лаборатории экологической генетики Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт общей генетики имени Н. И. Вавилова Российской академии наук, г. Москва

**Научный руководитель:**

**АБИЛЕВ Серикбай Каримович,**

доктор биологических наук, профессор,

главный научный сотрудник лаборатории экологической генетики Федерального

государственного бюджетного учреждения науки Институт общей генетики имени Н.И.

Вавилова Российской академии наук, г. Москва

**Официальные оппоненты:**

**МАНУХОВ Илья Владимирович,**

доктор биологических наук,

заведующий лабораторией молекулярной генетики Федерального государственного

автономного образовательного учреждения высшего образования «Московский физико-

технический институт (национальный исследовательский университет), г. Москва

**МЕЛЬКИНА Ольга Евгеньевна,**

кандидат биологических наук,

исполняющий обязанности начальника лаборатории генетики бактерий Геномного центра

«Развитие генетических технологий для промышленной микробиологии» Курчатковского

комплекса НБИКС-природоподобных технологий Государственного научно-

исследовательского института генетики и селекции промышленных микроорганизмов

Национального исследовательского центра «Курчатовский институт», г. Москва

**Ведущая организация:**

Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего

образования «Южный федеральный университет», г. Ростов-на-Дону

Защита диссертации состоится «\_\_» \_\_\_\_\_ 2023 г. в \_\_\_\_ часов на заседании диссертационного совета 24.1.088.01 (Д 002.214.01) в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институте общей генетики им. Н.И. Вавилова Российской академии наук по адресу: 119991, г. Москва, улица Губкина, д. 3, конференц-зал.

С диссертацией и авторефератом можно ознакомиться в библиотеке и на сайте Института

[www.vigg.ru](http://www.vigg.ru); e-mail: [dissovet@vigg.ru](mailto:dissovet@vigg.ru) тел.8-499-135-14-31.

Автореферат разослан «\_\_» \_\_\_\_\_ 2023 г.

Учёный секретарь диссертационного совета,

доктор биологических наук

Горячева И. И.

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

### Актуальность и разработанность темы исследования:

Дейтерий был обнаружен американским физхимиком Г.К. Юри в качестве естественного изотопа водорода в воде, которая содержит приблизительно 0,015% оксида дейтерия. Тяжелая вода вызвала огромный интерес и широкое применение в промышленности, биологии и медицине. Способность оксида дейтерия 2600-кратно замедлять нейтроны, по сравнению с обычной водой, повсеместно используется в производстве ядерной энергии, в качестве теплоносителя и замедлителя в тяжеловодородном ядерном реакторе.

Дейтерированные органические соединения могут быть обнаружены с высокой чувствительностью различными методами, в том числе с помощью масс-спектрометрии. Благодаря этому, а также низкой токсичности дейтерированных соединений (по сравнению с радиоактивными), такие препараты, как и  $D_2O$ , широко используются в исследованиях обмена веществ и действия лекарственных препаратов у людей и животных.

Было установлено, что оксид дейтерия ( $D_2O$ ) отрицательно влияет на рост многих микроорганизмов, особенно эукариотических. Оксид дейтерия в высоких концентрациях частично подавлял синтез белков и нуклеиновых кислот, изменял клеточную морфологию и нарушал деление клеток. У млекопитающих (мыши, крысы, собаки) приводил к стерильности, острым неврологическим симптомам, гиперплазии печени и анемии. Рыбы, головастики, плоские черви не способны были выжить в среде с высоким содержанием оксида дейтерия.

Однако микроорганизмы могут адаптироваться к жизни в среде с содержанием  $D_2O$  до 98%, что позволяет получить дейтерированные вещества для медико-биологических целей. Так был получен первый дейтерированный препарат гризеофульвин, противогрибковое средство, синтезированное с помощью грибов-продуцентов *Penicillium janczewskii*. Дейтерированная форма данного препарата была эффективнее противевой.

Разрыв С-Н (углерод-водородных) связей является общей особенностью метаболизма лекарственных препаратов. Аналогичная дейтериевая связь С-D устойчивее в 10 раз. Эта особенность широко используется при создании фармпрепаратов. Дейтерирование приводит к изменению фармакокинетики за счет снижения метаболизма и

при сохранении фармакологических свойств препарата позволяет уменьшить его дозу. А также снижает токсичность, уменьшая образование токсичных метаболитов.

Дейтерирование влияет на транспорт и проникновение лекарственных препаратов, улучшая поступление препарата в необходимые ткани. Может влиять на устойчивость лекарственных средств к их инактивации, таким образом были получены более эффективные противомикробные препараты.

Несмотря на длительную историю изучения влияния тяжелого изотопа водорода на живые организмы и значительный прогресс в данной теме, исследований эффектов дейтерия на уровне генетических процессов пока недостаточно. Есть небольшое количество работ, посвященных данной тематике, в них анализировался модифицирующий эффект дейтерия на ДНК-повреждающее действие перекиси водорода, в процессе окислительного стресса, на экспрессию гена *GFP*, а также ряд работ, где рассматривается влияние недостатка дейтерия в воде на экспрессию некоторых генов.

Применение активно разрабатываемых в настоящее время дейтерированных препаратов или использование воды с пониженным содержанием дейтерия в рамках адьювантной противоопухолевой терапии приводят, на уровне организма, к смещению изотопных градиентов, что влияет на биохимические, клеточные и генетические процессы. Что показывает актуальность исследования влияния дейтерия на биологические системы, и особенно, исследование его генетических эффектов.

#### **Цель исследования:**

Целью данной работы является изучение модифицирующего действия дейтерия на активность химических генотоксикантов в прокариотической клетке, т.е. изучение влияния дейтерирования на индуцибельные процессы, обусловленные уровнем повреждения ДНК в бактериальной клетке.

#### **Задачи исследования:**

1. Изучить влияние дейтерия на индуцированный генотоксикантами SOS-ответ в клетках *Escherichia coli*.
2. Исследовать влияние оксида дейтерия на токсический эффект химических соединений в бактериальной клетке.
3. Изучить действие дейтерия на индукцию алкилирующими соединениями активности *ada*-регулона в клетках биосенсора *E. coli* K12 MG1655 (pAlkA::lux).
4. Исследовать влияние дейтерирования на индуцированную экспрессию генов *ada*-регулона методом ОТ-ПЦР.

### **Научная новизна и практическая значимость исследования:**

В рамках диссертационной работы впервые исследуется модифицирующее действие D<sub>2</sub>O на генотоксическое воздействие химических соединений и УФ. Данные о генетических эффектах дейтерия позволят оценить влияние дейтерированных препаратов на организм человека.

Из 16 исследуемых мутагенов 10 используются в качестве фармпрепаратов, в виде бактерицидных средств: диоксидин, фурацилин, налидиксовая кислота и перекись водорода; противоопухолевых цитостатиков: митомицин С, цисплатин, стрептозотоцин и антиметаболита - 5-фторурацил. Для всех указанных препаратов было обнаружено потенцирующее действие дейтерия, что может быть использовано в медицинской практике для усиления эффекта выше указанных средств.

Впервые изучено влияние D<sub>2</sub>O на индукцию SOS-ответа в клетке *E.coli*, при этом исследовалась индукция экспрессии генов регулона, отвечающих за разные этапы SOS-репарации, что в дальнейшем может быть полезно для более детального понимания механизмов репарации.

Впервые исследовано действие дейтерия на активацию экспрессии *ada*-регулона алкилирующими соединениями: метилметансульфонатом, N-нитрозо-N-метилмочевинной и стрептозотоцином. У человека гомолог продукта гена *ada E. coli* влияет на отсутствие чувствительности химиотерапии опухолей с использованием алкилирующих цитостатиков. Полученные результаты увеличения активности последних оксидом дейтерия, может быть применено для терапии.

### **Положения, выносимые на защиту:**

1. Дейтерирование клеток повышает ДНК-повреждающую активность 4-НХО, НММ, митомицина С, фурацилина, цисплатина, налидиксовой кислоты и 2-аминопурина в бактериальных клетках.
2. Дейтерирование клеток *Escherichia coli* усиливает действие алкилирующих соединений: метилметансульфоната, N-нитрозо-N-метилмочевины и стрептозотоцина.
3. D<sub>2</sub>O увеличивает бактерицидное действие 4-НХО, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> и УФ-облучения на клетках *Escherichia coli*.

### **Личный вклад автора:**

Все основные результаты были получены лично автором, либо при его участии в планировании и проведении экспериментов. Часть экспериментов была проведена

совместно с сотрудниками группы Мутагенеза и репарации ИОГен им. Н. И. Вавилова РАН.

#### **Степень достоверности и апробация результатов:**

Работа выполнена с использованием современных экспериментальных методов, которые соответствуют поставленным задачам. Доклады по теме диссертации проводились на ежегодных отчетах аспирантов ФГБУН ИОГен РАН. Промежуточные и итоговые результаты диссертационной работы были представлены на международных конференциях. Устные доклады были представлены на 52-м собрании Environmental Mutagenesis and Genomics Society (Virtual, 2021) и IV Международной научной конференции GLP-PLANET, совместно с ассоциацией по лабораторным животным RUS-Lasa (Санкт-Петербург, 2023); стендовый доклад – на Международной научно-практической конференции «Аспекты и инновации биотехнологии окружающей среды и биоэнергетики» (Алматы, Республика Казахстан, 2021). Апробация диссертационной работы проведена на межлабораторном семинаре ИОГен РАН (протокол № 8 от 4 октября 2023 г.).

#### **Публикации:**

По материалам диссертации опубликовано 8 статей в научных рецензируемых изданиях, рекомендованных ВАК, а также 7 статей в сборниках материалов конференций.

#### **Структура и объём диссертационной работы:**

Диссертация включает в себя следующие главы: «Введение», «Обзор литературы», «Материалы и методы», «Результаты и обсуждение», «Заключение», «Выводы» и «Список литературы». Работа изложена на 126 страницах машинописного текста, включая 4 страницы Приложений, содержит 16 рисунков и 17 таблиц. Список цитируемых литературных источников включает 243 наименований, из которых 232 - на английском языке.

### **ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ**

**Во ВВЕДЕНИИ** обоснована актуальность выбранной темы исследования, описана научная новизна, теоретическая и практическая значимость работы, сформулированы цели и задачи исследования, представлены основные положения, выносимые на защиту.

## ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

В главе описаны различия и особенности изотопных эффектов дейтерия. Приведены сведения о влиянии оксида дейтерия на биологические системы, включая его действие на физиологические и биохимические процессы у лабораторных животных, способность ингибировать митоз, воздействие на злокачественные клетки и повышение термостабильности макромолекул. Представлены данные по получению дейтерированных лекарственных препаратов и изменению в фармакологических свойствах уже существующих средств путем их дейтерирования. Изложена информация по генетическим эффектам дейтерия, в том числе влияние нехватки дейтерия на экспрессию генов. Даны общие сведения о структуре SOS-ответа у *E. coli*: порядок индукции генов SOS-регулона и особенности регуляции процесса репарации. Подробно рассмотрены гены *recA*, *dinI* и гены колицинов, их структура и функции. Описан *ada*-регулон, репарационная и регуляторная функции белка Ada. Выполнен обзор применяемых тест-систем на основе люминесцентных бактерий, приведена принципиальная схема строения гибридной схемы строения плазмиды *lux*-биосенсора.

## ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

### Биосенсоры

В работе использованы 4 *lux*-биосенсора: *E. coli* MG1655 (pRecA::*lux*), *E. coli* MG1655 (pColD::*lux*), *E. coli* MG1655 (pDinI::*lux*) и *E. coli* MG1655 (pAlkA::*lux*) (далее обозначены как PRecA, PColD, PDinI и PAlkA соответственно). Данные штаммы содержат гибридные плазмиды, несущие *luxCDABE* оперон фотобактерии *Photobacterium luminescens*, поставленный под контроль промоторов генов *recA*, *cda (colD)*, *dinI* и *alkA*. Гены оперона *luxA* и *luxB* кодируют  $\alpha$ - и  $\beta$ -субъединицы люциферазы, а гены *luxCDE* определяют синтез трех-субъединичного комплекса редуктазы жирных кислот (редуктазы, синтазы и трансферазы), ведущего восстановление жирных кислот до альдегида (тетрадеканаль), являющегося субстратом люциферазы. Последняя является флавинзависимой монооксигеназой, которая катализирует реакцию окисления длинноцепочечных алифатических альдегидов (RCHO) при участии восстановленного флавинмононуклеотида (FMNH<sub>2</sub>), продуктом реакции является излучение кванта света в сине-зеленой области видимого спектра:



Биолюминесценция, получаемая в результате данной реакции, используется в качестве репортерной функции. Она специфически свидетельствует об активации SOS-системы у

*E. coli*, в случае штаммов PRecA, PColD, PDinI, и *ada*-регулона, для штамма PAIka. Биосенсоры предоставлены Г.Б. Завильгельским и А.В. Мануховым (ГосНИИгенетика, г. Москва).

### **Обоснование выбора индукторов**

Используемые генотоксиканты можно разделить на группы по механизму воздействия на ДНК:

1. Алкилирующие вещества (метилметансульфонат (ММС), N-нитрозо-N-метилмочевина (НММ), стрептозотозин) - соединения, которые реагируют с нуклеофильными (электроотрицательными) участками в молекулах нуклеиновых кислот и белков, формируя ковалентные связи, заменяя атомы водорода на алкильные группы.
2. Соединения, вызывающие межнитевые и внутринитевые сшивки ДНК (митомицин С и цисплатин), приводящие к блокировке синтеза ДНК и к индукции SOS-ответа.
3. Аналоги оснований нуклеиновых кислот (5-бромурацил, 2-аминопурин, 5-фторурацил).
4. Вещества, метаболиты которых образуют аддукты с ДНК (4-нитрохинолин-1-оксид (4-НХО) и фурацилин).
5. Красители, интеркалирующие в ДНК (бромистый этидий и 9-аминоакридин).
6. Ингибиторы ДНК-гиразы (налидиксовая кислота и ципрофлоксацин).
7. Вещества, инициирующие свободнорадикальное окисление (перекись водорода ( $H_2O_2$ ), диоксидин), приводящее к одонитевым разрывам ДНК.
8. Ультрафиолет (УФ), образование пиримидиновых димеров.

Кроме этого все используемые индукторы можно разделить на две большие группы по сфере их применения. В первую группу вошли применяемые в медицинской практике бактерицидные средства: диоксидин, фурацилин, ципрофлоксацин, налидиксовая кислота и перекись водорода, а также противоопухолевые цитостатики – mitoмицин С, цисплатин, стрептозотозин и антиметаболит 5-фторурацил. Во вторую группу вошли классические мутагены, которые широко используются в работах по мутагенезу: 4-НХО, ММС, НММ, аналоги оснований 2-аминопурин и 5-бромурацил и интеркаляторы бромистый этидий и 9-аминоакридин.

### **Индукторы**

Все тестируемые химические соединения были аналитической чистоты. Митомицин С, цисплатин (цис-диаминодихлорплатина (II)), 4-НХО (4-нитрохинолин-1-оксид), НММ (N-нитрозо-N-метилмочевина), ММС (метилметансульфонат), стрептозотозин, 2-аминопурин, 5-фторурацил и 5-бромурацил, 9-аминоакридин,

бромистый этидий, от «SigmaChemical Co» (США). Ципрофлоксацин от «Промед Экспорте Pvt. Лтд» (Индия), налидиксовая кислота от «Хиноин» (Венгрия). Лекарственные препараты из российских фармацевтических компаний: диоксидин ("Мосхимфармпрепараты"), фурацилин («Гатхимфармпрепараты»), перекись водорода («Ferraine»). В работе использовали D<sub>2</sub>O производства Chemical Line (Россия). Все растворы тестируемых соединений готовили непосредственно перед их использованием.

Для облучения культур использовали ртутную лампу низкого давления OSRAM PURITEC HNS, как источник УФС с  $\lambda \geq 254$  нм в диапазоне 12-60 Дж/м<sup>2</sup>. Дозу облучения контролировали трехканальным УФ-радиометром ТКА-ПКМ (12).

### **Подготовка культуры**

Культуры клеток *E. coli* выращивали на полноценной среде Луриа-Бертани (LB) с добавлением ампициллина в конечной концентрации 100,0 мкг/мл в течение ночи при температуре 37<sup>0</sup>С. В день эксперимента ночную культуру разбавляли свежей средой в 10 раз (10<sup>6</sup> клеток/мл). Измерения проводили на денситометре DEN-1B («Biosan»). Затем суспензию культивировали в течение 2 часов при 37<sup>0</sup>С на 120 об/мин. до ранней логарифмической фазы.

### **Определение амплитуды ответа**

На первом этапе исследования определялись активные дозы индукторов. Для этого аликвоты культуры (по 160 мкл) переносились в стерильные ячейки планшета, в них же добавлялись индукторы в разных концентрациях в объеме 20 мкл, в качестве контроля использовали дистиллированную воду или соответствующий растворитель. Общий объем доводили водой до 200 мкл. В случае подбора доз УФ контролем служила необлученная культура. Через 60 и 90 минут инкубации планшетов при 37<sup>0</sup>С проводили измерения люминесценции на микропланшетном ридере StatFax 4400, Awareness Technology Inc (США). В качестве главного параметра индукции люминесценции исследуемыми генотоксикантами определяли амплитуду ответа (АО) биосенсоров по следующей формуле:  $R = (I_t - I_0) / (I_k - I_0)$ , где  $I_0$  – интенсивность люминесценции в момент добавления генотоксиканта ( $t = 0$ ),  $I_k$  – интенсивность люминесценции в контроле (отсутствие генотоксиканта) в момент  $t$ ,  $I_t$  – интенсивность люминесценции под действием генотоксиканта в момент  $t$ .

### **Дейтерирование культуры**

На следующем этапе определялось эффективное время предейтерирования. Здесь в качестве индуктора был выбран 4-нитрохинолин-1-оксид (4-НХО) в концентрации 0,00008 моль/л и биосенсор PCoID. К аликвотам культуры (160 мкл) в ячейки планшета

добавляли 20 мкл D<sub>2</sub>O до конечных концентраций 5; 7,5; 9 и 10%. После инкубации культуры в среде с дейтерием от 15 до 90 минут при температуре 37<sup>0</sup>С, добавляли 20 мкл индуктора. Люминесценцию измеряли через 90 минут инкубации культуры с индуктором (37<sup>0</sup>С).

Далее исследовали действие индукторов в ранее выбранных эффективных дозах на предейтерированной культуре в течение 90 минут. Интенсивность биолюминесценции выражали в относительных единицах светового потока (relative light units – RLU). Модифицирующее действие оксида дейтерия на ДНК-повреждающую активность генотоксикантов рассчитывалось в качестве отношения  $D=I_i/I_n$ , где  $I_i$  – уровень люминесценции культуры, предейтерированной различными концентрациями D<sub>2</sub>O в среде (5%; 7,5%; 9%; 10%),  $I_n$  – уровень люминесценции недедейтерированной культуры.

#### **Анализ совместной токсичности D<sub>2</sub>O и индукторов SOS-ответа с нормированием люминесценции на кое**

Для анализа совместной токсичности оксида дейтерия и генотоксикантов подготовленную, как указано выше, культуру инкубировали в лунках планшета в течение 90 минут при 37<sup>0</sup>С с конечным содержанием оксида дейтерия 7,5 или 10%. После добавления 20 мкл воды в контрольные ячейки и различных концентраций 4-НХО, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> или облучения разными дозами УФ инкубация продолжалась ещё 90 минут. Далее с планшетов снималась люминесценция, культуру из лунок разводили в 10<sup>6</sup> раз и наносили на чашки Петри с агаризованной полноценной средой с концентрацией ампициллина 100мкг/мл. Чашки инкубировали при 37<sup>0</sup>С в течение ночи, на следующий день подсчитывались выросшие колонии. На основании этих данных полуночно нормировали люминесценцию на 10<sup>7</sup> кое/мл.

#### **Подход для снижения экранирующего действия питательной среды при облучении бактерии УФ-светом**

Культуры биосенсоров, выращенные до ранней логарифмической фазы, центрифугировали при 10 000g для осаждения бактерий, осадок ресуспендировали в равном объёме натрий-фосфатного буфера (PBS). Аликвоты суспензии (по 160 мкл) наносили в лунки стерильного планшета и облучали УФ в диапазоне доз 12-60 Дж/м<sup>2</sup> с интервалом 12 Дж/м<sup>2</sup>, контролем служила необлученная культура. После облучения в каждую лунку добавляли 40 мкл бульона LB и инкубировали 90 минут при 37<sup>0</sup>С. Затем проводили измерение люминесценции на микропланшетном ридере StatFax 4400, Awareness Technology Inc (США).

Для дейтерирования использовали бактериальные культуры, выращенные до ранней логарифмической фазы, как описано выше. После осаждения клеточный осадок

ресуспендировали в PBS с содержанием D<sub>2</sub>O 5; 7,5; 9 и 10%; полученную суспензию наносили в лунки планшета и облучали УФ в дозе 12 Дж/м<sup>2</sup>. Объем в лунках доводили до 200 мкл бульоном LB, и инкубировали планшеты в течение 90 минут при 37°C. По истечении времени инкубации измеряли интенсивность люминесценции, выраженную в относительных единицах светового потока (relative light units – RLU).

#### **Исследование влияния D<sub>2</sub>O на экспрессию генов *ada*, *alkA* и *luxA Escherichia coli*, индуцированную метилметансульфонатом методом ОТ-ПЦР**

С целью получения дополнительного доказательства влияния D<sub>2</sub>O на транскрипцию *ada*-регулона проведено исследование экспрессии хромосомных генов *alkA* и *ada*, входящих в *ada*-регулон *E. coli*, и плазмидного гена *luxA*, находящегося под контролем промотора гена *alkA*, с помощью метода ОТ-ПЦР. Для сравнительного изучения индукции *ada*-регулона в дейтерированных и в недейтерированных (контрольных) культурах *E. coli* использовали биосенсор *E. coli* K12 MG1655 (pAlkA-lux), люминесцирующий в результате активации промотора гена *alkA* в ответ на алкилирование ДНК. Дейтерирование бактериальной культуры проводили в среде с содержанием D<sub>2</sub>O в концентрации 7,5% в течение 90 минут. Затем в контрольную и дейтерированную культуры добавляли ММС в концентрации 0,5 ммоль/л и инкубировали в течение 20 минут. Далее образцы центрифугировали, отбирали супернатант и осадок растворяли в 1 мл реагента для выделения РНК (ExtractRNA, Евроген, РФ). После ряда процедур, проведенных в соответствии с рекомендациями производителя реагента ExtractRNA, полученную РНК обрабатывали ДНКазой (ThermoFisherSci., США). Очищенные образцы РНК далее использовали для синтеза кДНК с помощью набора QuantiTectRev. TranscriptionKit (Qiagen, США). Брали до 100 нг очищенной от ДНК РНК, добавляли 1 мкл RT-Transferase, 1 мкл Primermix, 4 мкл буфера и доводили до 20 мкл RNA free водой. Смеси образцов инкубировали 17 минут при 42°C, далее – 3 минуты при 95°C в амплификаторе QuantStudio 5 Real-Time PCR (ThermoFisherSci., США). Полученную кДНК использовали для ОТ-ПЦР с помощью набора SYBR Green PCR mix (Евроген, РФ) и праймеров:

Forward *rrsA* CAACGAGCGCAACCCTTATC

Revers *rrsA* AGGGCCATGATGACTTGACG

Forward *luxA* TGTTCTTCCCACCGCTCATC

Revers *luxA* CCGTACCAGCACTCCGTТАА

Forward *alkA* GCACAGCTTTATGGCGAACG

Revers *alkA* TTTCATCGCCTGCTCCACAT

Forward *ada* GACGATCAACGCTGGCAATC

Revers *ada* CGCTGGCATTGCGTAGAAG

В качестве референсного был использован ген *rrsA* 16S РНК рибосомы, экспрессирующийся конститутивно.

### **Статистический анализ данных**

Данные люминесценции использованных биосенсоров при определении их АО на действие индукторов, анализе эффективности режима дейтерирования, исследовании модифицирующего действия D<sub>2</sub>O и анализе влияния совместной токсичности, а также данные о количестве жизнеспособных клеток штамма *E. coli* MG1655 (pRecA:*lux*) в следствие дейтерирования и последующей обработке генотоксикантом были получены в трех независимых экспериментах в восьми повторностях. Для полученных результатов рассчитывались средние значения по группам и стандартная ошибка среднего. Достоверность различий значений люминесценции дейтерированной культуры и недеитерированного контроля оценивали с помощью двустороннего двухвыборочного t-теста с уровнем значимости  $p < 0,05$ .

В случае анализа экспрессии генов методом ОТ-ПЦР для каждого из анализируемых генов определялось значение порогового цикла Ct. Данные Ct, полученные в 3-5 экспериментальных повторностях, анализировались с помощью построения диаграммы размаха (BoxPlot) с отображением медианы, диапазона значений, распределенных между первым и третьим квартилями, и размаха от минимального до максимального значения Ct.

## **ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ**

### **Определение амплитуды ответа (АО) биосенсоров**

Тестирование индукторов проведено на 4 lux-биосенсорах PRecA, PCold, PDinI и PAIkA в 8 повторностях в 3 независимых экспериментах. По данным интенсивности биолюминесценции при 60 и 90 минутах инкубации используемых сенсорных штаммов при воздействии на них генотоксикантов рассчитаны амплитуды ответа (АО), отражающие отношение интенсивности люминесценции в присутствии индуктора к таковой в отрицательном контроле на момент измерения люминесценции. АО выражается в относительных единицах.

По показателям АО биосенсоров можно судить о максимально эффективных концентрациях тестируемого агента. Минимальные концентрации исследуемых генотоксичных агентов, вызывающие статистически значимое повышение индуцированной люминесценции над контролем представляют собой пороговые значения эффективных доз индукторов при воздействии на используемые lux-биосенсоры.

АО биосенсора PColD при действии митомицина С, диоксида, 4-НХО, ципрофлоксацина, налидиксовой кислоты, MMC, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> и УФ превышает таковые у PRecA и PDinI. Однако повышенное значение АО у PColD в случае тестирования налидиксовой кислоты, ципрофлоксацина, НММ и MMC наблюдалось при более высоких концентрациях этих соединений, чем на штаммах PRecA и PDinI.

Из данных по АО биосенсоров PColD, PRecA и PDinI следует, что АО PDinI более выражена, чем АО PRecA, при действии алкилирующих агентов: НММ и MMC; антибактериального препарата диоксида и цитостатиков: митомицина С и цис-платины. При действии нитрофуранового соединения фурацилина; нитрохинолинового соединения 4-НХО; ингибиторов ДНК-гиразы: налидиксовой кислоты и ципрофлоксацина; а также УФ различия в АО этих биосенсоров минимальны.

Биосенсор PDinI при действии цитостатика митомицина С показал более высокую АО=27, чем PRecA (АО=6,9) при 90 минут экспозиции. Также алкилирующий цитостатик стрептозотоцин был более активен на биосенсоре PDinI (АО=7,3), чем на PRecA (АО=5,1). В случае цис-платины, которая также как и митомицин С, вызывает внутринитевые аддукты и межнитевые сшивки в ДНК, АО у обоих биосенсоров были ниже и составили для PDinI АО=8,6; PRecA АО=5,1.

Наиболее эффективными индукторами SOS-ответа на основе оценки пороговых доз оказались митомицин С, цис-платина, диоксидин и ципрофлоксацин.

Самый низкий уровень индукции SOS-ответа наблюдался для групп аналогов оснований и интеркалирующих красителей. Из последних, бромистый этидий ингибировал люминесценцию биосенсоров и не превысил порог спонтанной люминесценции в случае штаммов PColD и PRecA. Для 9-аминоакридина амплитуды ответа были минимальны и составили: PColD АО=1,9; PRecA АО=1,5; PDinI АО=1,6.

Аналоги оснований тестировались в концентрациях  $10^{-2}$  –  $10^{-4}$  моль/л. Активность 2-Аминопурина для всех трех lux-биосенсоров при 90 минут инкубации была в интервале от 2,0 до 2,9; при этом она строго коррелировала со временем инкубации (PColD АО=2,4; PRecA АО=2,9; PDinI АО=2,0). 5-Бромурацил проявил бóльшую активность на PRecA (АО=4,6) и PDinI (АО=4,6), чем на штамме PColD (АО=1,6). 5-Фторурацил индуцировал SOS-ответ у биосенсоров PColD (АО=1,3) и PRecA (АО=1,5) только при 90 минут инкубации, у биосенсора PDinI АО=3,6 при тех же условиях.

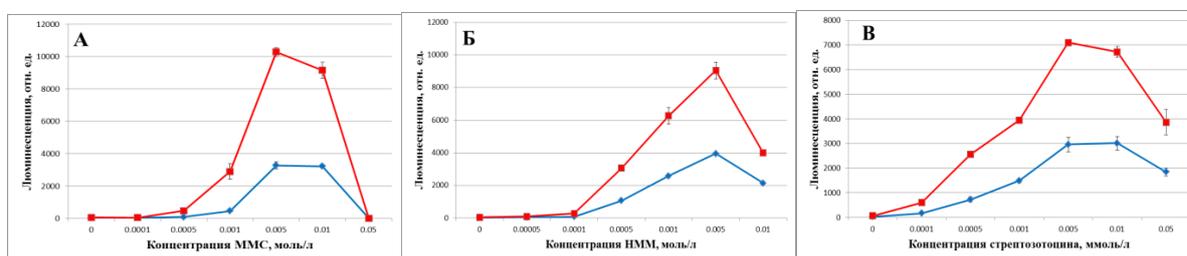
Результаты изучения индукции экспрессии гена *alkA* алкилирующими агентами метилметансульфонатом (MMC), N-нитрозо-N-метил-мочевинной (НММ) и стрептозотоцином в клетках биосенсора *E. coli* MG1655 (pAlkA::lux) при экспозиции в течение 60 и 90 минут приведены на рис. 1. Показателем экспрессии гена *alkA* является

интенсивность люминесценции биосенсора, выраженная в относительных единицах светового потока. ММС вызывал достоверное повышение люминесценции биосенсора, начиная с концентрации 0,0005 моль/л, при этом максимальный уровень ответа зафиксирован при концентрации 0,005 моль/л (рис. 1А). Величина ответа коррелировала с временем инкубации, так интенсивность люминесценции при 90 минут экспозиции с ММС превысила в 4 раза люминесценцию штамма РА1кА при 60 минут.

Максимальную индукцию люминесценции биосенсора при 90 минут экспозиции наблюдали при концентрации НММ 0,005 моль/л, так же как и в случае ММС. Оба мутагена подавляли люминесценцию при концентрациях более 0,05 моль/л, что свидетельствует о токсическом эффекте данных веществ на клетки РА1кА (рис. 1А, Б). Графики зависимости уровня люминесценции от дозы генотоксикантов показывают, что ММС в концентрации 0,005 моль/л более активен, чем НММ, и в концентрациях  $\geq 0,05$  моль/л проявлял большую токсичность.

Наиболее эффективно индуцировал экспрессию гена *alkA* стрептозотоцин, о чем можно судить по низким пороговым концентрациям вещества ( $10^{-9}$  моль/л), вызывающим значимый ответ биосенсора РА1кА. Максимальный уровень люминесценции наблюдался при концентрации стрептозотоцина  $5 \times 10^{-5}$  моль/л при 90 минут инкубации клеток биосенсора с генотоксикантом (рис.1В). При концентрациях стрептозотоцина  $\geq 5 \times 10^{-5}$  моль/л наблюдалось снижение люминесценции биосенсора вследствие токсичного эффекта.

Максимальная АО биосенсора РА1кА, специфично регистрирующего алкилирующие соединения, наблюдалась для НММ и составила АО=415,5; далее по величине ответа идёт ММС АО=181,6 и стрептозотоцин АО=119,0 при 90 минут экспозиции.

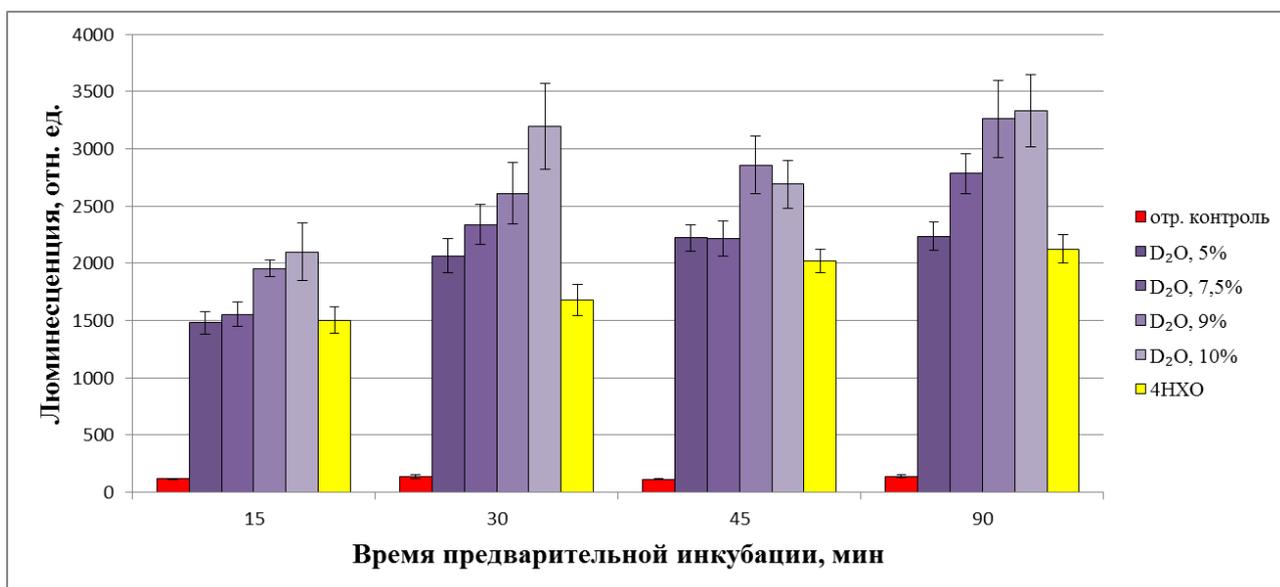


**Рисунок 1.** Показатели интенсивности люминесценции биосенсора РА1кА при воздействии ММС (А), НММ (Б) и стрептозотоцина (В); экспозиция 60 (синяя линия) и 90 (красная линия) минут.

### Определение эффективного режима дейтерирования

Для исследования изучалось влияние продолжительности предварительного дейтерирования бактерий на модифицирующий эффект D<sub>2</sub>O использовался биосенсор

PCoID, регистрирующий SOS-ответ, и мутаген 4-НХО в подобранной ранее эффективной концентрации  $8 \times 10^{-4}$  моль/л. D<sub>2</sub>O в концентрациях 9 и 10% усиливал SOS-ответ, индуцированный 4-НХО, начиная с 15 минут предварительного дейтерирования клеток биосенсора (рис. 2). Люминесценция предейтерированной культуры в концентрациях 7,5; 9 и 10% значительно превышала уровень люминесценции недейтерированной культуры при 90 минут инкубации.



**Рисунок 2.** Влияние концентрации D<sub>2</sub>O в инкубационном растворе и продолжительности предварительного дейтерирования биосенсора PCoID на SOS-ответ, индуцированный 4-НХО в концентрации  $8 \times 10^{-5}$  моль/л.

### **Изучение действия дейтерия на индуцированный генотоксикантами SOS-ответ на биосенсорах *E.coli* MG1655 (pRecA::lux), *E.coli* MG1655 (pColD::lux) и *E.coli* MG1655 (pDinI::lux)**

Используемые генотоксиканты, различающиеся по механизму повреждающего действия на ДНК, были разделены по данному признаку на группы, и полученные результаты (рис.3) модифицирующего действия D<sub>2</sub>O сравнивались, как внутри групп, так и между ними.

Наибольший потенцирующий эффект D<sub>2</sub>O обнаружен для групп генотоксикантов, образующих аддукты с ДНК, и веществ, ведущих к образованию межнитевых и внутринитевых сшивок ДНК. Максимальный эффект D<sub>2</sub>O обнаружен при индукции SOS-ответа фурацилином у штаммов PCoID (D=4,03) при содержании 7,5% D<sub>2</sub>O в среде инкубации, значения показателя модифицирующего действия D при этом наблюдались в диапазоне 1,95-4,03. Уровень люминесценции 3 биосенсоров при использовании аддуктообразователя 4-НХО увеличивался на всем интервале используемых концентраций

D<sub>2</sub>O в условиях предейтерирования. Наибольший потенцирующий эффект D<sub>2</sub>O зафиксирован на штамме PColD (10% D<sub>2</sub>O) при значениях показателя D 1,86-2,08. Увеличение люминесценции дейтерированных культур относительно недейтерированного контроля зафиксировано и для митомицина С и для *цис*-платина. Потенцирующий эффект предварительного дейтерирования на индукцию SOS-ответа митомицином С в среднем был выше, составив диапазон значений D 1,25-1,75. В случае использования *цис*-платины изменения показателя D наблюдались при 1,09-1,44. Максимальный эффект предейтерирования проявлялся для обоих использованных генотоксикантов на штамме PColD при инкубации клеток в среде с содержанием 9% D<sub>2</sub>O. Биосенсор PRecA демонстрировал минимальный эффект предейтерирования на индуцированный SOS-ответ митомицином С и *цис*-платины при концентрации D<sub>2</sub>O 10%.

Из группы ингибиторов ДНК-гираз при предварительном дейтерировании клеток биосенсоров PRecA, PDinI и PColD в течение 90 минут наблюдалось повышение уровня люминесценции, только индуцированной налидиксовой кислотой (рис 3). Наибольшие значения показателя D зафиксированы для штамма PColD (1,68-2,36) и PDinI (1,52-1,97) с максимальным потенцирующим эффектом при культивировании бактерий в среде с содержанием 9% D<sub>2</sub>O. В случае штамма PRecA изменения показателя D наблюдались в диапазоне значений 1,24-1,40.

Из аналогов оснований при предварительном дейтерировании биосенсоров в течение 90 минут наблюдали значимое повышение уровня индуцированной 2-аминопурином люминесценции относительно недейтерированного контроля клеток всех используемых штаммов. Наибольший потенцирующий эффект предейтерирования зафиксирован у штамма PDinI при содержании 9% D<sub>2</sub>O в среде культивирования, в этом случае диапазон значений показателя модифицирующего действия дейтерия D составил 1,27-2,22, для PColD он наблюдался в диапазоне 1,46-1,51, для PRecA – 1,16-1,63 (рис3).

Таким образом, установлено, что предварительная инкубация бактерий *E. coli* в среде с содержанием D<sub>2</sub>O приводит к повышению SOS-индуцирующей активности 12 протестированных химических соединений и УФ (коэффициент потенцирующего действия дейтерия наблюдался в диапазоне 1,2 – 4,0 в зависимости от генотоксиканта и концентрации оксида дейтерия в инкубационной среде).

**Рисунок 3.** Значения показателя модифицирующего действия дейтерия на ДНК-повреждающую активность генотоксикантов при предварительном дейтерировании биосенсоров PColD, PRecA и PDinI в течение 90 минут ( $D=I_i/I_n$ , где  $I_i$  – уровень люминесценции культуры, предейтерированной различными концентрациями D<sub>2</sub>O в среде (5%; 7,5%; 9%; 10%),  $I_n$  – уровень люминесценции недедейтерированной культуры.) (серым выделены значения, не превысившие уровень значимости  $p<0,05$ ).

Химическое соединение	pColD				pRecA				pDinI			
	D <sub>2</sub> O 5%	7,5%	9%	10%	5%	0,1	9%	10%	5%	7,5%	9%	10%
Цис-платин Митомицин С	1,31	1,36	1,44	1,27	1,16	1,16	1,16	1,09	1,06	1,11	1,22	1,30
	1,61	1,70	1,75	1,52	1,29	1,30	1,34	1,25	1,67	1,65	1,61	1,60
4-НХО Фурацилин	1,86	1,97	1,98	2,08	1,47	1,63	1,82	1,69	1,44	1,64	1,83	1,70
	1,95	4,03	2,78	2,69	2,23	2,53	1,40	0,89	1,61	1,62	1,95	1,91
Налидиксовая кислота Ципрофлоксацин	1,68	2,31	2,36	2,21	1,33	1,40	1,24	1,05	1,52	1,80	1,97	1,85
	0,93	0,87	0,88	0,91	0,96	0,96	0,88	0,84	0,96	0,91	0,89	0,86
НММ ММС Стрептозоцин	1,50	1,54	1,47	1,36	1,39	1,46	1,52	1,29	0,95	1,10	1,16	1,03
	1,09	0,99	0,95	1,18	1,21	1,24	1,14	1,00	1,08	1,24	1,47	1,38
	1,16	1,24	1,35	1,51	1,11	1,13	1,16	1,14	1,15	1,18	1,14	1,12
Диоксидин H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	1,43	1,54	1,57	1,36	0,93	0,95	0,95	1,02	1,10	1,16	1,17	0,98
	0,99	1,17	1,06	1,02	0,96	1,08	1,08	1,10	0,97	1,02	1,10	1,11
9-АА	0,96	0,88	0,87	0,77	0,84	0,81	0,79	0,67	0,95	0,82	0,81	0,78
2-аминопурин 5-бромурацил 5-фторурацил	1,02	1,49	1,46	1,51	1,16	1,34	1,63	1,22	1,27	1,64	2,22	2,14
	0,90	0,81	0,82	0,75	0,87	0,82	0,77	0,75	0,98	1,01	0,82	0,81
	0,91	0,91	0,92	1,09	0,76	0,88	0,78	0,89	0,95	0,97	0,97	0,91
УФ	1,21	1,44	1,90	2,43	0,82	0,97	1,11	1,54	0,80	0,95	1,14	1,64

шкала



**Изучение модифицирующего действия дейтерия на ДНК-повреждающую активность алкилирующих агентов на биосенсоре *E.coli* MG1655 (pAlkA::lux)**

Модифицирующий эффект оксида дейтерия исследовался на биосенсоре *E. coli* K12 MG1655 (pAlkA::lux) с использованием в качестве индукторов экспрессии гена *alkA* алкилирующих соединений: ММС, НММ и стрептозотоцина. Эффект предейтерирования зависел не только от концентрации D<sub>2</sub>O, но и от самого мутагена. Максимальный уровень ответа наблюдали при концентрации D<sub>2</sub>O 7,5% в среде культивирования (табл.1). Предварительное дейтерирование клеток биосенсора в среде с содержанием 10% D<sub>2</sub>O приводило к резкому падению люминесценции, что, вероятно, указывает на синергидный токсический эффект D<sub>2</sub>O и используемых в данной работе алкилирующих агентов.

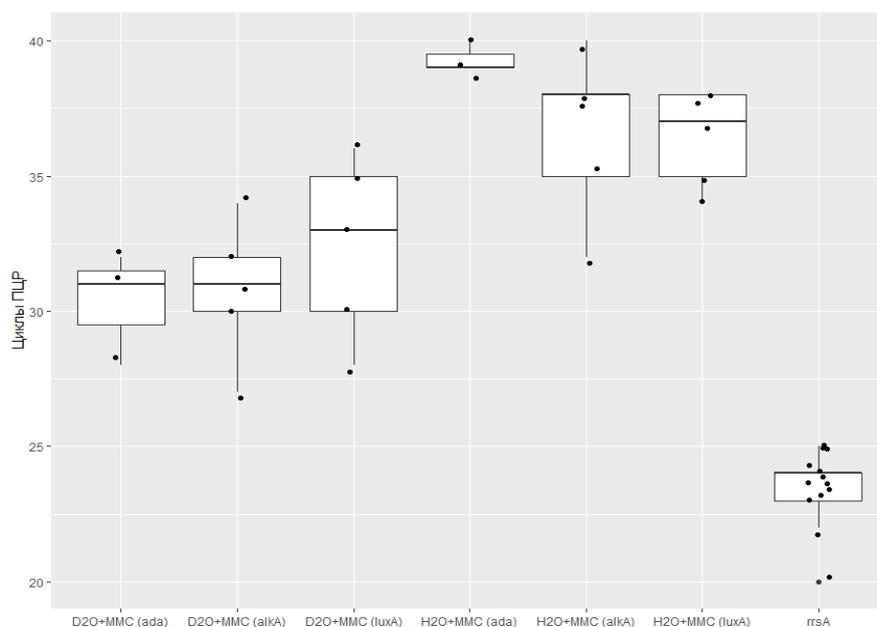
**Таблица 1.** Модифицирующее действие дейтерия на активность алкилирующих агентов на биосенсоре PAlkA (серым цветом выделены значения, не достигшие уровня значимости  $p < 0,05$ ).

Химическое соединение, концентрация в моль/л	Предейтерирование				Совместное дейтерирование			
	5%	7,5%	9%	10%	5%	7,5%	9%	10%
ММС, $5 \times 10^{-4}$	1,71 $1,7 \times 10^{-4}$	5,07 $2,9 \times 10^{-9}$	5,49 $1,1 \times 10^{-9}$	1,31 $3,9 \times 10^{-3}$	1,08 $1,6 \times 10^{-1}$	1,15 $1,7 \times 10^{-2}$	1,12 $3,6 \times 10^{-2}$	0,98 $7,1 \times 10^{-1}$
НММ, $5 \times 10^{-4}$	2,74 $4,3 \times 10^{-7}$	3,04 $1,5 \times 10^{-11}$	3,00 $5,3 \times 10^{-8}$	1,78 $1,3 \times 10^{-2}$	1,16 $6,6 \times 10^{-3}$	1,09 $8,2 \times 10^{-2}$	0,96 $5,1 \times 10^{-1}$	0,83 $6,2 \times 10^{-4}$
Стрептозотоцин, $10^{-5}$	1,87 $3,6 \times 10^{-5}$	1,87 $1,0 \times 10^{-4}$	1,81 $1,1 \times 10^{-4}$	1,41 $7,0 \times 10^{-3}$	1,07 $5,3 \times 10^{-1}$	1,04 $7,7 \times 10^{-1}$	1,05 $7,4 \times 10^{-1}$	1,03 $8,7 \times 10^{-1}$

На культуре, дейтерированной 9% D<sub>2</sub>O, активность ММС в концентрации  $5 \times 10^{-4}$  моль/л повышалась в 5,5 раз по сравнению с активностью на недедейтерированной культуре. Тогда как активность НММ, в эквимолярной с ММС концентрации, достигала максимума на дейтерированной культуре D<sub>2</sub>O 7,5% и превышала в 3 раза показатель активности на недедейтерированной. Стрептозотоцин, производное НММ, демонстрировал меньшую эффективность, повышая люминесценцию дейтерированных клеток биосенсора PAlkA в диапазоне значений 1,41-1,87.

**Исследование влияния D<sub>2</sub>O на экспрессию генов *ada*, *alkA* и *luxA* *Escherichia coli*, индуцированную метилметансульфонатом методом ОТ-ПЦР**

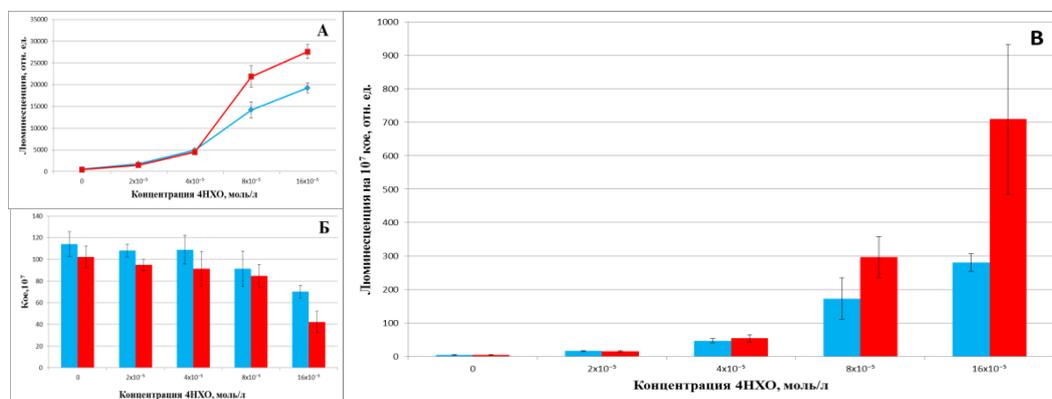
Результаты исследования действия дейтерирования на индуцированную экспрессию ММС представлены на диаграмме (рис.4). Как видно из рис.4, референсный ген *rss* начинает экспрессироваться на 22-25 циклах, тогда как исследуемые гены на 30-35 циклах в случае дейтерированных, и 35-39 циклах в случае недедейтерированных бактерий. Все эти данные указывают на усиливающее действие дейтерия (7,5% D<sub>2</sub>O) на экспрессию генов *ada*-регулона *E. coli*, индуцированную алкилирующим агентом ММС.



**Рисунок 4.** Распределение показателей экспрессии генов *luxA*, *alkA* и *ada* в клетках дейтерированных и недеитированных бактерий *E.coli*, индуцированной MMC (экспрессия референсного гена *rrsA* не зависела от дейтерирования бактерий).

#### Анализ влияния токсичности на результаты люминесценции

Для исследования токсичного действия 4-НХО, УФ и  $H_2O_2$  рассматривалась активность более широкого интервала концентраций индукторов при дейтерировании культур биосенсоров в одной концентрации оксида дейтерия 7,5 или 10%.



**Рисунок 5.** Влияние предварительного дейтерирования на индукцию 4-НХО экспрессии гена *recA* в среде с содержанием  $D_2O$  7,5%. Люминесценция биосенсора PRecA (А). Данные о выживаемости клеток биосенсора (Б). Люминесценция биосенсора PRecA в пересчете на количество выживших клеток (В). Голубой цвет – недеитированная культура, красный – дейтерированная.

Оксид дейтерия в концентрации 7,5% проявлял потенцирующий эффект на генотоксическое воздействие 4-НХО, начиная с концентрации  $8 \times 10^{-5}$  моль/л, на штамме биосенсора PRecA, зависимость люминесценции дейтерированной и недеитированной

культуры от концентрации индуктора представлена на рис.5А. Наличие оксида дейтерия в инкубационной среде значимо снижало выживаемость клеток только при максимальной, из протестированных, концентрации 4-НХО  $1,6 \times 10^{-6}$  моль/л (рис.5Б). В выживших клетках уровень люминесценции на кое был выше в дейтерированной культуре при концентрации 4-НХО  $1,6 \times 10^{-6}$  моль/л (рис.5В).

**Таблица 2.** Показатели люминесценции и выживаемости бактерий биосенсора PColD, облученного УФ-светом в дозе  $12 \text{ Дж/м}^2$  и инкубированного в течение 90 мин в питательной среде без и с D<sub>2</sub>O в концентрации 10%.

Показатели	Без D <sub>2</sub> O		+D <sub>2</sub> O 10%	
	Без УФ	УФ	Без УФ	УФ
Люминесценция, отн. ед.	1 685,4 ± 76,7	39 854,5 ± 3 798,9	1 485,4 ± 29,0	47 819,0 ± 4 615,6
Кое/мл, $10^7$	60,6 ± 6,7	20,3 ± 2,3	42,5 ± 1,5	11,9 ± 1,7
Выживаемость, %	100,0	33,4	70,1	19,6
Люминесценция на $10^7$ КОЕ, отн. ед.	30,2 ± 3,7	2 111,1 ± 268,6	35,2 ± 1,1	5 030,3 ± 1 230,0

В контрольном варианте эксперимента (без D<sub>2</sub>O) УФ снижал выживаемость бактерий с  $60,6 \times 10^7$  до  $20,3 \times 10^7$  кое ( $p=5,6 \times 10^{-5}$ ). Уменьшение числа кое при наличии 10% D<sub>2</sub>O в среде с  $60,6 \times 10^7$  до  $42,5 \times 10^7$  кое не было значимым ( $p=0,162$ ). Сочетание облучения и дейтерирования снижало выживаемость бактерий еще больше – с  $60,6 \times 10^7$  в контроле до  $11,9 \times 10^7$  кое ( $p=0,012$ ). В табл.2 также приведены результаты пересчета показателей интенсивности люминесценции биосенсора PColD на показатели выживаемости бактерий, то есть на  $10^7$  кое. Из представленных данных следует, что облучение биосенсора УФ в дозе  $12 \text{ Дж/м}^2$  приводит к усилению интенсивности люминесценции биосенсора с 2 111,1 в среде без D<sub>2</sub>O до 5 030,3 отн. ед. на  $10^7$  кое в среде с D<sub>2</sub>O. Интенсивность люминесценции биосенсора была в 2,5 раза выше в среде с дейтерием, чем без него.

Результаты для перекиси водорода представлены в табл.3. Из данных следует, что H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> вызывает незначительное понижение люминесценции биосенсора PResA в дейтерированной культуре. При оценке выживаемости клеток биосенсора наблюдалось значимое снижение выживаемости клеток при наличии 7,5% D<sub>2</sub>O в инкубационной среде. После нормирования люминесценции на кое/мл, в выживших клетках уровень люминесценции был выше в дейтерированной культуре, что свидетельствует о потенцирующем действии оксида дейтерия на идукцию H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> экспрессии гена *resA*.

**Таблица 3.** Влияние предварительного дейтерирования на индукцию H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> экспрессии гена *recA* в среде с содержанием D<sub>2</sub>O 7,5%.

Концентрации H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , моль/л	0		0,005		0,0075		0,01		0,025	
	Контроль	+D <sub>2</sub> O 7,5%	Контроль	+D <sub>2</sub> O 7,5%	Контроль	+D <sub>2</sub> O 7,5%	Контроль	+D <sub>2</sub> O 7,5%	Контроль	+D <sub>2</sub> O 7,5%
Люминесценция, отн. ед.	21 962,1 ± 243,5*	21 336,1 ± 245,7	120 835,1 ± 1 046,3	114 032,1 ± 2 833,0	115 292,3 ± 7 381,7	92 080,4 ± 9 240,9	147 374,1 ± 17 563,1	92 835,9 ± 14 185,8	369,1 ± 148,1	215,5 ± 46,1
Кое/мл, 10 <sup>7</sup>	479,0 ± 12,0	347,9 ± 9,9	299,4 ± 5,0	224,8 ± 11,2	242,7 ± 11,1	185,8 ± 12,9	176,8 ± 8,1	132,6 ± 8,4	68,6 ± 3,2	47,7 ± 1,8
Люминесценция на 10 <sup>7</sup> кое, отн. ед.	44,5 ± 1,2	63,1 ± 1,5	380,9 ± 6,6	537,5 ± 22,0	379,4 ± 11,6	620,5 ± 76,3	525,1 ± 143,7	1 111,4 ± 139,9	6,1 ± 3,2	5,6 ± 1,2

Анализ полученных в данной работе данных показал, что предварительное дейтерирование биосенсоров в течение 90 минут привело к значимому ( $p < 0,05$ ) повышению уровня SOS-ответа, количественно выраженного в относительных единицах люминесценции. При этом характерное время проявления влияния изотопного замещения протия на дейтерий в исследуемых системах составило десятки минут. Это исключает влияние очень быстрого изотопного замещения в легко диссоциируемых связях типа кислотных и спиртовых групп взаимодействующих молекул, но одновременно может служить указанием на определяющую роль изотопного замещения в ковалентных связях типа N–H и, наиболее вероятно, замещения во внутри- и межмолекулярных водородных связях.

Таким образом, обнаружено, что присутствие дейтерия усиливает действие генотоксикантов на индукцию транскрипции с промоторов генов, кодирующих ферменты систем репарации ДНК у *E.coli*. Вероятным объяснением полученных эффектов можно считать снижение дейтерированием активности ферментов репарации, что может привести к снижению скорости репарации участков ДНК, повреждённых генотоксикантом, и сдвигу баланса между скоростью накопления повреждений и скоростью восстановления исходной структуры ДНК ферментами системы репарации. В результате такого сдвига происходит накопление повреждений в структуре ДНК и в ответ на это происходит повышенная экспрессия SOS-ответа в клетке, обеспечивающая восстановление повреждённых участков ДНК.

Замена протия на дейтерий в комплексе взаимодействующих молекул ДНК и ферментов репликации, рекомбинации и репарации должна приводить к увеличению прочности связей (и водородных, и ковалентных) с соседними атомами в этих молекулах, что, вероятно, может приводить к снижению скорости и/или точности работы этих систем, а, возможно, и к их повреждению.

Иначе происходит прямая репарация алкилированных оснований, которая лежит в основе адаптивного ответа, представляющего собой реакцию клеток на воздействие малых доз алкилирующих соединений; она выражается в приобретении устойчивости к мутагенному и генотоксическому действию таких соединений в больших дозах. Адаптивный ответ у бактерий *E.coli* осуществляется белком Ada, имеющим репарационную и регуляторную функции. Активация белка Ada, как регулятора транскрипции, происходит в результате его алкилирования. Метилирование N-Ada домена приводит к повышению аффинности к промоторным участкам *ada*-регулона и превращает его в сильный транскрипционный активатор. В связи с этим метилирование N-Ada домена может играть существенную роль в изотопном эффекте D<sub>2</sub>O. Замена протия на дейтерий в

промоторных участках или в самом белке Ada может быть одним из главных факторов стабилизации связи между промотором и алкилированным белком, приводя к усилению транскрипции *ada*-регулона, так как известно, что дейтериевые связи стабильнее протиевых. Таким образом, в случае предварительного дейтрирования бактерий метилированный белок Ada остается на промоторе *ada*-регулона на более длительное время, что и обеспечивает более высокий уровень экспрессии генов регулона, чем у недейтерированных бактерий.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Были протестированы 17 генотоксичных агентов на 4 *lux*-биосенсорах: *E. coli* MG1655 (pRecA::*lux*), *E. coli* MG1655 (pColD::*lux*) *E. coli* MG1655 (pDinI::*lux*) и *E. coli* MG1655 (pAlkA::*lux*). Из 17 протестированных индукторов 8 эффективнее индуцировали экспрессию колицинового гена *cda*, о чем свидетельствовали наибольшие АО биосенсора PColD на генотоксиканты: митомицин С, диоксидин, 4-НХО, ципрофлоксацин, MMC, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 9AA, УФ. Наиболее эффективно индуцировали SOS-ответ на трех штаммах PRecA, PColD и PDinI вещества, инициирующие свободнорадикальное окисление: диоксидин и H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, алкилирующие вещества: НММ и MMC; а также, вызывающий аддукты 4-НХО и ведущий к образованию межнитевых и внутринитевых сшивок митомицин С. Максимальная АО биосенсора PAlkA на алкилирующие агенты наблюдалась в ответ на индукцию экспрессии *ada*-регулона НММ.

Исследовано влияние предейтрирования культуры в инкубационной среде с содержанием D<sub>2</sub>O 5-10% на действие генотоксичных агентов. Показано, что дейтерий приводит к повышению SOS-индуцирующей активности 4-НХО, НММ, митомицина С, фурацилина, цисплатина, налидиксовой кислоты и 2-аминопурина, диоксидина на штамме PColD, а также MMC и УФ в клетках биосенсора PDinI. В режиме совместного с генотоксикантом дейтрирования *lux*-биосенсоров потенцирующее действие дейтерия не обнаружено.

Изучено модифицирующее действие дейтерия на ДНК-повреждающую активность алкилирующих агентов на биосенсоре PAlkA. Предварительная инкубация клеток биосенсора в среде с содержанием D<sub>2</sub>O 5-10% приводит к повышению экспрессии гена *alkA*, индуцированной стрептозотоцином, MMC и НММ.

При исследовании совместной токсичности D<sub>2</sub>O и 4-НХО, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, УФ на биосенсоре *E. coli* MG1655 (pRecA::*lux*) обнаружено повышение бактерицидного действия генотоксичных агентов в дейтерированной культуре. Показан потенцирующий эффект дейтерия на индуцирующее SOS-ответ действие H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> и УФ в выживших клетках.

## ВЫВОДЫ

1. Впервые проведено исследование влияния предварительного дейтерирования бактерий *E. coli* на генотоксические эффекты 16 химических соединений, относящихся к различным группам по ДНК-повреждающей способности.
2. Предварительная инкубация бактерий *E. coli* в среде с содержанием D<sub>2</sub>O приводит к повышению SOS-индуцирующей активности 12 протестированных химических соединений и УФ (коэффициент потенцирующего действия дейтерия наблюдался в диапазоне 1,2 – 4,0 в зависимости от генотоксиканта и концентрации оксида дейтерия в инкубационной среде).
3. Предейтерирование бактерий *E. coli* приводит к повышению экспрессии гена *alkA*, индуцированной НММ, ММС и стрептозотоцином (коэффициент потенцирующего действия дейтерия 1,3 – 5,5).
4. Предварительное дейтерирование клеток *E. coli* в среде с содержанием D<sub>2</sub>O 7,5% приводит к повышению летального действия 4-НХО, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> и УФ на бактерии и одновременно усиливает их генотоксичность, регистрируемую по уровню индукции SOS-ответа в жизнеспособных клетках.
5. При совместной инкубации D<sub>2</sub>O и рассматриваемых генотоксикантов индуцирующая активность последних значимо не повышалась.

## СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

### Публикации в журналах, соответствующих Перечню ВАК:

1. Абилов, С. К., **Смирнова, С. В.**, Игонина, Е. В., Пармон, В. Н., и Янковский, Н. К. (2018). Оксид дейтерия усиливает SOS-ответ клеток *Escherichia coli*, индуцированный генотоксикантами. Доклады Академии наук, 480(2), 239-243. DOI: 10.7868/S0869565218140219
2. **Смирнова, С. В.**, Абилов, С. К., Игонина, Е. В., Глазер, В. М., Пармон, В. Н., и Янковский, Н. К. (2018). Влияние дейтерия на индукцию *ada*-регулона алкилирующими веществами в клетках *Escherichia coli*. Генетика, 54(8), 1-7. DOI: 10.1134/S001667581808012X
3. Абилов, С. К., Игонина, Е. В., **Смирнова, С. В.**, и Рубанович, А. В. (2019). Влияние дейтерия на экспрессию индуцибельных генов у *Escherichia coli*. Радиационная биология. Радиоэкология, 59(3), 305-310. DOI: 10.1134/S0869803119030032
4. **Смирнова, С.В.**, Шапиро, Т.Н., Игонина, Е.В., Абилов, С.К. (2020) Оксид дейтерия усиливает SOS-ответ *Escherichia coli*, индуцированный бактерицидными средствами. Медицинская генетика, 19(9):79-80. DOI: 10.25557/2073-7998.2020.09.79-80
5. Абилов, С.К., Котова, В.Ю., **Смирнова, С.В.**, Шапиро, Т.Н., и Завильгельский, Г.Б. (2020). Специфические Lux-биосенсоры *Escherichia coli*, содержащие плазмиды pRecA::lux, pColD::lux и pDinI::lux, для детекции генотоксичных агентов. Генетика, 56(6), 648-656. DOI: 10.31857/S0016675820060028
6. Свиридова, Д.А., **Смирнова С.В.**, Абилов С. К. (2022). Усиление оксидом дейтерия экспрессии генов *ada*, *alkA* и *luxA* *Escherichia coli*, индуцированных метилметансульфонатом. Генетика, 58(4):1–4. DOI: 10.1134/S1022795422040135
7. Абилов, С.К., **Смирнова, С.В.**, Шапиро, Т.Н. (2022). Влияние оксида дейтерия на экспрессию генов *recA* и *colD*, индуцированную УФ-облучением в клетках *Esherichia coli*. Радиоэкология, 62(5): 495-501. DOI: 10.31857/S0869803122040038
8. Abilev, S.K., Igonina, E.V., Sviridova, D.A., **Smirnova, S.V.** (2023). Bacterial lux biosensors in genotoxicological studies. Biosensors, 13(5), 511. DOI: 10.3390/bios13050511

### Публикации в сборниках материалов конференций:

1. Абилев С.К., **Смирнова С.В.**, Игоница Е.В. Изучение влияния оксида дейтерия на индуцированный генотоксикантами SOS-ответ клеток *Escherichia coli*. Сборник материалов международной научно-практической конференции «Актуальные проблемы экологической генетики и экспериментальной биологии». Алматы, 2018 с.3
2. **Смирнова С.В.**, Игоница Е.В., Абилев С.К. Влияние дейтерия на индукцию адаптивного ответа алкилирующими веществами в клетках *E. Coli*. Сборник материалов международной научно-практической конференции «Актуальные проблемы экологической генетики и экспериментальной биологии». Алматы, 2018 с.41
3. Абилев С.К., **Смирнова С.В.**, Игоница Е.В. Тяжелая вода усиливает генотоксичность химических соединений. Сборник материалов международного симпозиума «Астана Биотех 2018» с.52
4. Абилев С.К., **Смирнова С.В.**, Игоница Е.В. Модифицирующее действие тяжелой воды на генотоксичность химических соединений. Тезисы докладов VII Съезда ВОГиС. Санкт-Петербург, 2019 с.116
5. **Смирнова С.В.**, Шапиро Т.Н., Абилев С.К. Оксид дейтерия увеличивает SOS-ответ в клетках *Escherichia coli*, индуцированный ДНК-повреждающим действием фурацилина. Сборник материалов международной научно-практической конференции «Аспекты и инновации биотехнологии окружающей среды и биоэнергетики». Алматы, Казахстан, 2021 с.202
6. **Smirnova S.V.**, Shapiro T.N., Abilev S.K. (2021). Deuteration increases the sensitivity of *Escherichia coli* to UVC DNA damaging effect. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 62(S1), 74
7. **Смирнова С.В.**, Шапиро Т.Н., Абилев С.К. Использование тест-системы на основе люминесцентных штаммов *Escherichia coli* для оценки генотоксичности химических веществ. Сборник тезисов Всероссийской школы-конференции «Сохранение и преумножение генетических ресурсов микроорганизмов». Санкт-Петербург, 22-23 июня 2022 г. с.40-41