

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ  
ИНСТИТУТ ОБЩЕЙ ГЕНЕТИКИ им. Н.И. ВАВИЛОВА  
РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК

*На правах рукописи*

**СМИРНОВА СВЕТЛАНА ВЛАДИМИРОВНА**

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

специальность 1.5.7 – генетика

**ДИССЕРТАЦИЯ**

на соискание ученой степени кандидата биологических наук

**Научный руководитель:**

**д.б.н., проф. Абилев Серикбай Каримович**

Москва – 2023

## ОГЛАВЛЕНИЕ

ОГЛАВЛЕНИЕ.....	2
ВВЕДЕНИЕ.....	4
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	10
1.1 Изотопные эффекты дейтерия.....	10
1.2 Влияние D <sub>2</sub> O на биологические системы.....	13
1.3 Дейтерирование в фармакологии.....	19
1.4 Генетические эффекты дейтерия.....	24
1.5 SOS-ответ у <i>Escherichia coli</i> .....	27
1.5.1 Ген <i>recA</i> .....	31
1.5.2 Ген <i>dinI</i> .....	32
1.5.3 Колицины.....	34
1.6 <i>ada</i> -регулон.....	36
1.7 Использование тест-систем на основе люминесцентных бактерий.....	39
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.....	45
2.1 Обоснование выбора штаммов.....	45
2.2 Биосенсоры.....	47
2.3 Обоснование выбора индукторов.....	47
2.4 Индукторы.....	48
2.5.1 Подготовка культуры.....	49
2.5.2 Определение амплитуды ответа.....	49
2.5.3 Дейтерирование культуры.....	50
2.5.4 Анализ совместной токсичности D <sub>2</sub> O и индукторов SOS-ответа на клетках биосенсора <i>E. coli</i> MG1655 (pRecA::lux) и нормирование люминесценции на кое.....	50
2.5.6 Исследование влияния D <sub>2</sub> O на экспрессию генов <i>ada</i> , <i>alkA</i> и <i>luxA</i> <i>Escherichia coli</i> , индуцированную метилметансульфонатом методом ОТ-ПЦР.....	52
2.6 Статистический анализ данных.....	53
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ.....	52
3.1 Определение амплитуды ответа биосенсоров.....	54
3.1.1 Анализ эффективности генотоксикантов для индукции SOS-ответа у штаммов <i>E. coli</i> MG1655 (pRecA::lux), <i>E. coli</i> MG1655 (pColD::lux) и <i>E. coli</i> MG1655 (pDinI::lux).....	55

3.1.2 Анализ эффективности алкилирующих соединений индуцировать экспрессию <i>ada</i> -регулона по люминесценции биосенсора <i>E.coli</i> MG1655 (pAlkA:: <i>lux</i> ) .....	61
3.2 Анализ эффективного режима дейтерирования .....	64
3.3 Исследование модифицирующего действия дейтерия на индуцибельные процессы в клетках <i>E.coli</i> .....	65
3.3.1 Изучение действия дейтерия на индуцированный генотоксикантами SOS-ответ на биосенсорах <i>E.coli</i> MG1655 (pRecA:: <i>lux</i> ), <i>E.coli</i> MG1655 (pColD:: <i>lux</i> ) и <i>E.coli</i> MG1655 (pDinI:: <i>lux</i> ).....	67
3.3.1.1 Алкилирующие соединения.....	68
3.3.1.2 Соединения, образующие межнитевые и внутринитевые сшивки ДНК.....	72
3.3.1.3 Аналоги оснований нуклеиновых кислот.....	75
3.3.1.4 Вещества, вызывающие образование аддуктов с ДНК.....	77
3.3.1.5 Ингибиторы ДНК-гиразы.....	80
3.3.1.6 Вещества, инициирующие свободнорадикальное окисление.....	84
3.3.2 Изучение модифицирующего действия дейтерия на ДНК-повреждающую активность алкилирующих агентов на биосенсоре <i>E.coli</i> MG1655 (pAlkA:: <i>lux</i> ) .....	91
3.3.3 Исследование влияния D <sub>2</sub> O на экспрессию генов <i>ada</i> , <i>alkA</i> и <i>luxA</i> <i>Escherichia coli</i> , индуцированную метилметансульфонатом методом ОТ-ПЦР.....	94
3.4 Анализ влияния токсичности на результаты люминесценции биосенсора <i>E.coli</i> MG1655 (pRecA:: <i>lux</i> ) .....	95
3.4.1 Исследование совместной токсичности D <sub>2</sub> O и 4-НХО.....	95
3.4.2 Исследование совместной токсичности D <sub>2</sub> O и УФ.....	96
3.4.3 Исследование совместной токсичности D <sub>2</sub> O и H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	97
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	100
ВЫВОДЫ.....	102
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	103
ПРИЛОЖЕНИЯ.....	132

## ВВЕДЕНИЕ

Дейтерий был обнаружен американским физхимиком Г.К. Юри в качестве естественного изотопа водорода в воде, которая содержит приблизительно 0,015% оксида дейтерия [Urey *et al.*, 1932]. 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<sub>2</sub>O, широко используются в исследованиях обмена веществ и действия лекарственных препаратов у людей и животных.

Было установлено отрицательное влияние оксида дейтерия (D<sub>2</sub>O) на рост целого ряда микроорганизмов, особенно эукариотических. Высокие концентрации оксида дейтерия влияли на клеточные процессы, нарушая деление и меняя клеточную морфологию, а также ингибировал синтез белков и нуклеиновых кислот. 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<sub>2</sub>O 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 несколько 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 адъювантной 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.

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. Для реализации этой цели были выделены следующие задачи:

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*).

### **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: налидиксовая кислота, ципрофлоксацин, диоксидин, фурацилин и перекись водорода; противоопухолевых цитостатиков: митомицин С, *цис*-платина, нитрозометилмочевина, 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, *цис*-платины, 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.

**Апробация диссертационной работы:**

Доклады по теме диссертации проводились на ежегодных отчетах аспирантов ФГБУН ИОГен РАН. Автором опубликовано 8 статей по теме диссертации в научных рецензируемых изданиях, рекомендованных ВАК, а также 7 статей в сборниках материалов конференций. 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 теме диссертации в научных журналах:**

1. Абилев, 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.**, Абилев, 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. Абилев, 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., Абилев, 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. Абилев, 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.**, Абилев 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. Абилев, С.К., **Смирнова, С.В.**, Шапиро, Т.Н. (2022). Влияние оксида дейтерия на экспрессию генов *recA* и *colD*, индуцированную УФ-облучением в клетках *Escherichia 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 по теме диссертации в сборниках материалов конференций:**

1. Абилев С.К., **Смирнова С.В.**, Игонина 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.**, Игонина 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.**, Игонина Е.В. Тяжелая вода усиливает генотоксичность химических соединений. Сборник материалов международного симпозиума «Астана Биотех 2018» с.52
4. Абилев С.К., **Смирнова С.В.**, Игонина 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

## ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

### 1.1 Изотопные эффекты дейтерия

Дейтерий ( $^2\text{H}$ , D) отличается от водорода удвоенной атомной массой, имеет отдельное название, отличное от самой распространенной формы (протия). Массы других стабильных изотопов ( $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$  и  $^{18}\text{O}$ ), которые используются в биологических исследованиях, мало чем отличаются от преобладающей формы каждого из этих элементов ( $^{12}\text{C}$ ,  $^{14}\text{N}$  и  $^{16}\text{O}$ ), поэтому изотопный эффект D более ярко выражен. Наличие нейтрона в ядре изменяет физические и химические свойства соединений дейтерия по сравнению с соединениями протия (таблица 1.). Таким образом, масса молекулы  $\text{D}_2\text{O}$  на 11% превышает массу  $\text{H}_2\text{O}$ . Тяжелая вода кипит при  $101,44^\circ\text{C}$ , замерзает при  $3,82^\circ\text{C}$ , имеет плотность при  $20^\circ\text{C}$   $1,10539 \text{ г/см}^3$ , при максимуме плотности не  $4^\circ\text{C}$ , как у обычной воды, а  $11,2^\circ\text{C}$  ( $1,10602 \text{ г/см}^3$ ). Кристаллы  $\text{D}_2\text{O}$ , имея такую же структуру, как у обычного льда, являются более тяжелыми ( $0,982 \text{ г/см}^3$  при  $0^\circ\text{C}$  по сравнению с  $0,917 \text{ г/см}^3$  для обычного льда). Отличия в других физических свойствах менее заметны. Дейтериевые связи в  $\text{D}_2\text{O}$  прочнее аналогичных водородных связей в  $\text{H}_2\text{O}$  [Audi *et al.*, 2003; Eisenberg and Kauzmann, 1969]. В растворе с водой на высокой скорости происходит изотопный обмен дейтерия с протием:  $\text{H}_2\text{O} + \text{D}_2\text{O} \leftrightarrow 2\text{HDO}$ , благодаря которому, в растворах атомы дейтерия присутствуют в составе молекул HDO.

В общем смысле действие  $\text{D}_2\text{O}$  на живые системы можно разделить на два типа. Одним из них является «изотопный эффект растворителя», связанный с особыми свойствами оксида дейтерия как растворителя, его влиянием как на структуру воды, так и макромолекул. Второй эффект - «эффект изотопа дейтерия», который объясняется способностью  $\text{D}_2\text{O}$  замещать H на D в любых биологических молекулах. Связь C–D в 10 раз прочнее, чем C–H, и значительно более устойчива к химическому и ферментативному расщеплению. Соединения со связями C–D могут

оставаться стабильными в  $\text{H}_2\text{O}$  продолжительное время, что повсеместно используется в изотопных исследованиях. O–D, N–D и S–D связи также устойчивее, чем протиевые, однако D в таких связях быстро обменивается с H в воде [Thomas, 1971]. Изотопный эффект дейтерия стандартно рассматривается для C–D связей, потому что дейтерирование других связей в биологических молекулах под действием оксида дейтерия происходит быстро и обратно, что затрудняет оценку биологических последствий изотопного обмена.

**Таблица 1.** Сравнение физических свойств тяжелой ( $\text{D}_2\text{O}$ ) и легкой ( $\text{H}_2\text{O}$ ) воды.

Физические свойства	$\text{D}_2\text{O}$	$\text{H}_2\text{O}$
Температура плавления ( $^{\circ}\text{C}$ )	3,82	0,00
Температура кипения ( $^{\circ}\text{C}$ )	101,72	100,00
Плотность ( $\text{г/см}^3$ , при $20^{\circ}\text{C}$ )	1,1056	0,9982
Плотность кристаллов ( $\text{г/см}^3$ , при $0^{\circ}\text{C}$ )	0,982	0,917
Температура максимальной плотности ( $^{\circ}\text{C}$ )	11,6	4,0
Вязкость (Сантипуаз, при $20^{\circ}\text{C}$ )	1,25	1,005
Поверхностное натяжение ( $\text{дин}^*\text{см}$ , при $25^{\circ}\text{C}$ )	71,93	71,97
Теплота плавления (кал/моль)	1515	1436
Теплота парообразования (кал/моль)	10864	10515

Отношение скорости расщепления С-протонированного к С-дейтерированному соединению,  $V_{\max}^H / V_{\max}^D$ , выражает «первичный» изотопный эффект дейтерия, обычно просто называемый изотопным эффектом [Northrop, 1982; Foster, 1985]. «Вторичный» изотопный эффект дейтерия возникает, когда присоединение D к другому атому влияет на скорость расщепления С–Н связи; такие эффекты обычно невелики.

Существование изотопного эффекта дейтерия при сравнении протонированных и дейтерированных соединений широко использовалось, чтобы показать, связь метаболических реакций с разрывом связей С–Н. Эта методика была использована для изучения метаболизма тестостерона [Darbyshire *et al.*, 1994], для исследования механизмов химического гидролиза пенициллановой кислоты [Deraniyagala *et al.*, 1995]. Н-D обмен применялся для изучения реакции антиген-антитело [Paterson *et al.*, 1990] и механизма образования  $H_2$  метаногенными бактериями [Klein *et al.*, 1995]. Кроме этого он лег в основу метода масс-спектрометрии с водородно-дейтериевым обменом, который широко используется для исследования структуры белков, оценки и разработки моноклональных антител, конъюгатов антитело-лекарственное средство, для количественной оценки белок-белковых взаимодействий, участвующих в сигнальных путях [Deng *et al.*, 2016].

Не всегда возможно отделить изотопный эффект растворителя от изотопного эффекта дейтерия. Если рост и деление клеток, или даже биосинтез происходит в присутствии  $D_2O$ , могут образовываться дейтерированные молекулы. Многие эксперименты с животными, растениями или микроорганизмами проводятся в течение длительного времени, нескольких часов, дней или дольше, поэтому за это время существенное количество молекул может дейтерироваться, в отличие от краткосрочного воздействия на изолированные клетки или ферменты, где, вероятнее всего, имеет место изотопный эффект растворителя.

## 1.2 Влияние D<sub>2</sub>O на биологические системы

Вскоре после появления чистого D<sub>2</sub>O стало изучаться его влияние на биологические системы [Katz, 1960; Thomson, 1963]. Животные либо выпаивались большими объемами оксида дейтерия, либо им производили инъекции с ним, что приводило к высокому содержанию D<sub>2</sub>O в крови и жидкостях организма животных и, по-видимому, к дейтерированию многих молекул. Мыши, крысы и собаки с замещением около 25% водорода дейтерием оставались здоровым в течение длительного времени и производили сперматозоиды и яйцеклетки, но были стерильными. Более высокие уровни дейтерирования приводили к острым неврологическим симптомам, гиперплазии печени, анемии и, в конечном итоге, к смерти. Физиологические нарушения и связанные с ними ферментативные изменения оказались обратимы при возвращении животных к нормальному режиму поения, хотя остаточное количество дейтерия находилось в различных тканях, в частности в тканях мозга в течение некоторого времени. Высокая концентрация D<sub>2</sub>O (около 90%) в окружающей среде быстро убивала рыб, головастиков, плоских червей и дрозофил.

Позднее исследования показали, что прием внутрь тяжелой воды влияет на формирование и свойства клеток крови млекопитающих. У мышей наблюдались ухудшение кроветворения, снижение образования тромбоцитов, нейтрофилов и особенно лимфоцитов крови [Adams and Adams, 1988].

В то время как высокие концентрации D<sub>2</sub>O являлись токсичными для животных, в небольших количествах оксид дейтерия такого эффекта не проявлял. Он широко использовался для исследования водной среды в организме животных, в том числе людей всех возрастных групп [Coward, 1979], а также использовался в качестве индикатора в испытании лекарственных средств [Rodewald *et al.*, 1989]. Обычно применяли 0,1 мл на 1 кг воды от общей массы воды, содержащейся в теле, т.е. 5–7 мл для взрослого человека, что увеличивало содержание D<sub>2</sub>O в крови до 150 - 300

промилле, которое впоследствии уменьшалось до нормального уровня с периодом выведения в несколько дней. Концентрации  $D_2O$  до 23% в жидкостях организма человека в течение коротких периодов времени были признаны не токсичными [Wallace *et al.*, 1995].

Некоторые исследования показали, что высокие концентрации оксида дейтерия могут иметь ценные фармакологические и даже клинические эффекты. В исследовании Vasdev с соавторами [1993, 1994] у групп крыс, получавших фруктозу или этанол, развивались повышенные систолическое артериальное давление и цитозольный кальций. Крысы, питавшиеся фруктозой, имели более высокий уровень глюкозы в плазме, инсулина и триглицеридов. У тех, которым давали этанол, наблюдалась гиперплазия гладких мышц, утолщение стенок мелких артерий и артериолы в почках. Включение 10%  $D_2O$  в питьевую воду для крыс, получавших этанол, и 5%  $D_2O$  в воду для крыс, питавшихся фруктозой, понижало кровяное давление и цитозольный кальций в обеих группах животных, оксид дейтерия предотвращал изменение почечных сосудов у крыс, получавших этанол, и снижал уровень триглицеридов в группе животных, питавшихся фруктозой. На метод с использованием тяжелой воды для лечения гипертонии у людей в США был получен патент [Lipins, 1993].

Laissue с соавторами [1987] обнаружили, что мыши, содержащиеся на диете с 29%  $D_2O$ , были менее восприимчивы к гамма-облучению всего тела в смертельных дозах. Хотя кроветворная и лимфоидная ткани были одинаково повреждены у дейтерированных и недейтерированных мышей, клетки костного мозга и другие клетки показали ускоренную регенерацию, предполагая, что дейтерирование защищало плюрипотентные стволовые клетки во время облучения. Напротив, добавление  $D_2O$  увеличивало пострадиационное повреждение в клетках китайского хомячка линии V-79 [Utsumi and Elkind, 1991].

Антимитотическое действие  $D_2O$  способствовало его использованию в качестве противоопухолевого средства. Однако эффективные концентрации

оксида дейтерия обычно были слишком токсичны для химиотерапии животных. Сочетание лечения цитостатическими препаратами с D<sub>2</sub>O, такими как метотрексат вызвало большее снижение роста опухоли, чем отдельное использование препарата, хотя не привело к окончательному излечению [Laissue *et al.*, 1982]. Другие исследования [Bauer *et al.*, 1995] показали, что тяжелая вода более эффективно убивала клетки злокачественных меланомы и карциномы (клетки рака толстой кишки, глиобластомы и мелкоклеточного рака легких), чем культивированные с фитогемагглютинином лимфоциты и нормальные глиальные клетки. Например, 90% D<sub>2</sub>O убивал 70% злокачественных клеток и только 5% нормальных. Также наблюдалось дифференцированное влияние на рост клеток: культивирование клеток с содержанием 90% D<sub>2</sub>O в течение 9 дней снижало выживаемость фракции злокачественных клеток примерно до 0,1%.

Способность оксида дейтерия ингибировать митоз связана с его влиянием на полимеризацию тубулина, а также на центры организации микротрубочек и формирование митотического веретена [Lamprecht *et al.*, 1991]. Показано также, что влияние D<sub>2</sub>O на образование гидрофобных связей вызывает стабилизацию образования микротрубочек у солнечников [Marsland *et al.*, 1971], оксид дейтерия в качестве активного полимеризатора тубулина *in vitro* был использован в клетках головного мозга крупного рогатого скота и яйцах морского ежа [Itoh and Sato, 1984], в гладкомышечных клетках сосудов крыс [Sollott *et al.*, 1995]. Разница в скорости полимеризации тубулина дейтерированных и недейтерированных клеток была положительной и увеличивалась с увеличением концентрации D<sub>2</sub>O, усиление полимеризации тубулина оксидом дейтерия стало результатом усиления внутри- и межмолекулярных гидрофобных взаимодействий молекул тубулина.

Высокие концентрации тяжелой воды могут быть эффективны в борнейтронозахватной терапии опухолей головного мозга, при которой опухоли, накопившие в своих клетках бор, подвергаются нейтронному облучению.

Последующее испускание  $\alpha$ -частиц и других радиоактивных лучей избирательно убивает эти клетки. Степень проникновения нейтронов в ткани ограничивает эффективность этого метода, но она может быть увеличена содержанием в тканях головного мозга 40% оксида дейтерия [Hatanaka, 1989, 1991; Wallace *et al.*, 1995]. Эта концентрация сохраняется только во время воздействия нейтронного пучка и быстро промывается перфузией солевым раствором в обычной воде.

В качестве растворителя  $D_2O$  повышает стабильность белков и других молекул за счет увеличения образования гидрофобных связей [Kresheck *et al.*, 1965]. Эта способность тяжелой воды может использоваться для поддержания стабильности вакцин без замораживания длительное время, в том числе вакцины против полиомиелита [Aldhous, 1995]. Оксид дейтерия также был показан для снижения высокой потребности в соли галофильных архебактерий, организмов, в которых соль играет главную роль в стабилизации гидрофобных связей [Kushner, 1998].

$D_2O$  повышая термостабильность макромолекул, не увеличивает термостабильность клеток. Unno с соавторами [1989] показали, что оксид дейтерия в разных случаях как повышает, так и понижает термочувствительность клеток млекопитающих. Также было обнаружено, что *Chlorella ellipsoidea*, выращенная в  $H_2O$ , менее чувствительна к нагреванию в  $D_2O$ , чем в  $H_2O$ , при этом чувствительность снижалась с увеличением концентрации  $D_2O$ . Тем не менее, *Chlorella ellipsoidea*, выращенная в  $D_2O$ , была более чувствительна, чем выращенная в  $H_2O$ , при нагревании в воде.

Повышенная термочувствительность дейтерированной хлореллы, вероятно, связана с пониженной способностью синтезировать белки теплового шока и (или) повышенной чувствительностью дейтерированных белков к тепловой денатурации [Unno and Okada, 1994]. Также было показано, что  $D_2O$  предотвращает образование белков теплового шока в культивируемых клетках куриного эмбриона [Edington *et al.*, 1989].

Рибулозо-1,5-бисфосфаткарбоксилаза/оксигеназа (Rubisco) дейтерированной *Chlorella ellipsoidea* была менее активна, чем фермент из клеток, выращенных в обычной воде, но его активность могла восстанавливаться путем добавления белков шаперонинов. Это предполагает, что дейтерирование затрудняет функциональную сборку Rubisco [Yokogaki *et al.*, 1995].

Одним из малоизученных эффектов D<sub>2</sub>O является его способность стабилизировать высокореактивные и токсичные формы кислорода. Синглетный кислород существует примерно в 10 раз дольше (120 мс по сравнению с 12 мс) в 90% оксиде дейтерия, чем в воде [Rodgers and Snowden, 1982]. Увеличенная продолжительность существования данной формы кислорода предположительно задействована в повышении фотосенсибилизированного разрушения клеток карциномы мочевого пузыря человека в D<sub>2</sub>O после обработки фотосенсибилизатором хлорином Е6 [Bachor *et al.*, 1991]. С этим также может быть связано разрушение клеток китайского хомячка линии V-70 под действием ионизирующего излучения при их суспендировании в 90% оксиде дейтерия [Utsumi and Elkind, 1991].

Также показано влияние D<sub>2</sub>O на тромбоциты *in vitro*: оксид дейтерия подавляет их распределение, ретракцию и агрегацию с помощью АДФ и коллагена и стимулирование их адреналиновой агрегации [Reuter *et al.*, 1985]. Эти эффекты на изменение тромбоцитов обсуждались с точки зрения мембранных рецепторов и энергетического обмена. Кроме этого, было обнаружено влияние D<sub>2</sub>O на микрофиламентные системы, которые могут быть ответственны за изменения в форме нейтрофильных гранулоцитов человека [Zimmermann *et al.*, 1988].

Vasilescu и Katona [1986] обнаружили, что D<sub>2</sub>O ингибирует биоэлектrogenез и сократительную способность в нервно-мышечных препаратах и электрические и механические функции в изолированном сердце лягушки. Оксид дейтерия снизил соотношение АТФ/АДФ во всех

исследованных тканях, а также сыграл роль антагониста для анестетиков в стволе седалищного нерва.

Конкуренция D – H может оказывать существенное влияние на Ca<sup>2+</sup> каналы. Vasdev с соавторами [1993, 1994] предположили, что антигипертензивный эффект D<sub>2</sub>O может быть связан с его способностью уменьшать проводимость кальциевых каналов L-типа в миоцитах и усвоение кальция в аортах крыс, получавших фенилэфрин и KCl. Показано, что ионы дейтерия могут конкурировать с протонами за один сайт в кальциевых каналах L-типа вентрикулярных миоцитов морской свинки [Proudhon *et al.*, 1987]. Связывание и отсоединение протонов от этого сайта необходимы для тока ионов Ca<sup>2+</sup>. Связывание D<sup>+</sup> с сайтом примерно в 2,5 раза медленнее, чем связывание H<sup>+</sup>, что может существенно уменьшить ток ионов кальция через каналы L-типа. Кроме этого, был замечен ряд эффектов D<sub>2</sub>O на функции мембраны, такие как, деполяризация мембраны и активация Ca<sup>2+</sup> каналов у водорослей, ингибирование Na<sup>+</sup> / K<sup>+</sup> АТФазы в мембране у животных [Andjus and Vucelic, 1990; Andjus *et al.*, 1994; Elsing *et al.*, 1995].

Оксид дейтерия в целом гораздо менее токсичен для микроорганизмов, чем для организмов многоклеточных. После периода адаптации, многие бактерии и водоросли могут расти в чистой тяжелой воде, хотя обычно медленнее, чем в обычной [Thomson, 1963; Katz, 1960; Crespi, 1982; Unno *et al.*, 1989; Vanatulu *et al.*, 1993; Haon *et al.*, 1993; Kushner *et al.*, 1997]. Простейшие могут расти в среде с содержанием D<sub>2</sub>O от 70% и выше. Способность микроорганизмов приспосабливаться к высоким концентрациям оксида дейтерия применяется для получения дейтерированных соединений, для использования их в фармакологических целях.

### 1.3 Дейтерирование в фармакологии

Лекарственные препараты, попадая в организм, подвергаются процессу детоксикации ксенобиотиков, метаболической трансформации, для облегчения их выведения путем повышения растворимости в воде [Guengerich, 2008]. Детоксикация ксенобиотиков (фармакологических

препаратов, токсичных агентов, канцерогенов, эндогенных метаболитов и т.д.) включает три последовательные фазы: 1) фаза активации, 2) фаза нейтрализации, 3) фаза выведения. Сначала поступающие в организм чужеродные соединения активируются с помощью ферментов семейства цитохромов P450 или микросомальных эпоксид-гидролаз, образуя короткоживущие промежуточные электрофильные метаболиты, которые обладают генотоксическими свойствами. Далее промежуточные метаболиты с помощью ферментов семейств глутатионтрансфераз, уридин-5-дифосфат глюкуронилтрансфераз, N-ацетилтрансфераз превращаются в водорастворимые нетоксические продукты, которые в последующем выводятся из организма. Основные ферменты, отвечающие за детоксикацию у человека, относятся к семейству ферментов цитохрома P450, на их долю приходится 75% общего метаболизма лекарств, что привлекает к ним большое внимание со стороны фармацевтической промышленности [Dudda and Kgrzel, 2006].

Разрыв C-H связей является общей особенностью метаболизма лекарственных препаратов, например, во время окисления в первой фазе детоксикации ксенобиотиков. Аналогичная связь C-D устойчивее в 10 раз, что снижает скорость обмена веществ. Поэтому замена водорода на дейтерий в молекулах препарата может привести к значительным изменениям в его метаболизме и тем самым способствовать изменению биологических эффектов лекарств. Дейтерирование приведет к изменению фармакокинетики за счет снижения скорости метаболизма препарата, что обеспечит его меньшее дозирование, и к снижению токсичности за счет уменьшения образования токсических метаболитов.

Первый полностью дейтерированный антибиотик, противогрибковое средство, гризеофульвин, был получен с помощью грибов-продуцентов *Penicillium janczewskii* [Nona et al., 1968]. Дейтерированная форма антибиотика обладала большей противогрибковой активностью в отношении *Microsporium gypseum*, чем его протиевая форма. Позже был изучен

дейтерированный пенициллин, полученный с использованием *Penicillium chrysogenum*. Для частично дейтерированного пенициллина продуценты выращивали на D<sub>2</sub>O с недейтерированным субстратом, дейтерированные субстраты использовали для получения высоко дейтерированной формы [Carlstedt *et al.*, 1973]. При тестировании на *Sarcina lutea*, было обнаружено, что высоко дейтерированный пенициллин имеет около 80% от активности протиевой формы. Его относительную восприимчивость к активности β-лактамазы не изучали. Однако, так как β-лактамаза разрывает связь С – N [Franklin and Snow, 1989], нет оснований считать, что дейтерирование может увеличить устойчивость к этому ферменту.

Дейтерированные (и тритированные) формы противоопухолевых средств RSU 1069 и Ro 03-8799, являющихся электронно-афинными радиосенсибилизаторами, связывающими ДНК, были синтезированы для изучения их метаболической активности [Webb and Threadgill, 1990]. Также были созданы дейтерированные (и тритированные) аналоги алкалоида камптотецина, другого противоопухолевого агента, который ингибирует топоизомеразу I, ключевой фермент в синтезе ДНК [Hinz *et al.*, 1996].

Дейтерированные аналоги нейротоксина МРТР (1-метил-4-фенил-1,2,3,6-тетрагидропиридин), который окисляется до более токсичных форм, были синтезированы для изучения биохимического пути данного препарата [Mabic and Castagnoli, 1996]. Дейтерированные аналоги нордiazепама и diaзeпама применялись в исследованиях изотопных эффектов в окислительных реакциях, катализируемых ферментами при воздействии лекарственных препаратов [Yang *et al.*, 1996]. Дейтерированные амины [Tsuzuki *et al.*, 1996], нестероидные противовоспалительные 2-арилпропионовые кислоты [Castell *et al.*, 1994], муколитический препарат домиодол [Ferraboschi *et al.*, 1994] и артемизинины, противомаларийные препараты [Avery *et al.*, 1996], синтезированы с целью изучения и отслеживания метаболизма активных веществ препаратов. Дейтерированный

пеницилламин был создан для спектроскопии ядерного магнитного резонанса пептидных гормонов и нейромедиаторов [Mosberg *et al.*, 1987].

Особый интерес представляют препараты, чьи дейтерированные формы имеют иной фармакологический эффект, чем их протиевые аналоги. Иногда меняются свойства из-за различного транспорта или проникновения самого препарата. Wenzel [1989] показал, что дейтерированные амфетамины легче поступали в мозг мышей и крыс, чем протиевые формы тех же соединений. Чаще изменения фармакологического действия наблюдается из-за изменений в метаболизме лекарств, как это происходит в реакциях, катализируемых системой цитохрома P450 печени [Archakov and Bachmanova, 1990]. Одним из ключевых шагов в подобных реакциях является разрыв связи C – H и образование связей C – D, что делает образовавшиеся структуры более устойчивыми к воздействию цитохрома P450. Это может привести к увеличению продолжительности фармакологического действия. Например, наблюдалось удвоение времени действия адренергического препарата *p*-тирамина, путем его предварительного дейтерирования. Похожий эффект был обнаружен у барбитурата бутетала, который был дейтерирован в положении, обычно подвергавшемся 3-гидроксилированию [Foster, 1984, 1985].

Иногда окисление не приводит к разрушению лекарственного средства, а ведет к образованию активного соединения. В таком случае дейтерирование может снизить активность препарата. Например, диазепам требует 3-гидроксилирования для развития противосудорожного действия. Диазепам, дейтерированный в положении 3, демонстрировал пониженный противосудорожный эффект, что вероятно связано с более низкой степенью 3-гидроксилирования [Foster, 1984]. Дейтерирование также может вызвать «метаболическое переключение», посредством чего пути метаболизма лекарственного средства изменяются количественно. Основной путь метаболизма антипирина осуществляется путем окисления метильной группы C3, с небольшим количеством де-N-метиляции. Однако, в случае

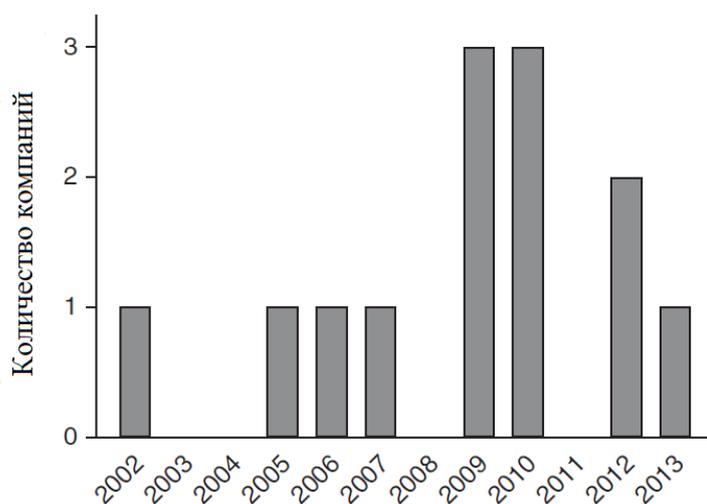
дейтерирования антипирина по метильной группе C3 наблюдалось слабое окисление данной группы у крыс, и основным путем метаболизма являлось деметилирование [Foster 1984, 1985].

Метаболиты многих лекарственных препаратов являются токсичными, и дейтерирование может снизить эту токсичность за счет снижения метаболизма. Для ряда галогенированных анестетиков были показаны их дейтерированные формы, сохранявшие фармакологические свойства, но с меньшей токсичностью [McCarty *et al.*, 1979]. Дейтерирование уменьшало высвобождение неорганического фтора микросомами печени крысы из анестетика севофлурана. Уровень фтора в крови обработанных дейтерированным препаратом животных был также снижен (в меньшей степени, чем в системе *in vitro*), наблюдались меньшие повреждения печени [Baker *et al.*, 1993]. У мышей выявлено значительное снижение токсического эффекта хлороформа ( $\text{CHCl}_3$ ) на печень и легкие, связанного с его превращением микросомами печени в фосген ( $\text{OCCl}_2$ ), путем дейтерирования препарата [Nelson, 1983].

Некоторые дейтерированные противомикробные препараты менее восприимчивы к разрушению микроорганизмами и, следовательно, являются более эффективными. К ним относятся жирные кислоты с длинной цепью, используемые в качестве противогрибковых средств [Abrahamsson *et al.*, 1982], и фтор-D-фенилаланин, действующий на ряд бактерий [Merck and Co., Inc. 1977]. Первые из указанных агентов разрушаются в результате  $\beta$ -окисления, а последние - путем окисления оксидазой D-аминокислот. Каждое из этих ферментативных воздействий включает разрыв связи C – H, вероятно, что соединения, обладающие более устойчивой C – D связью, менее подвержены инактивации.

С начала 2000-х годов изучение дейтерированных препаратов переживает рост, что отразилось в количестве международных патентных заявок на такие препараты среди крупных фармацевтических компаний: Pfizer [Lowe, 2002], Novartis [McCarthy, 2009], Abbott [Vasudevan *et al.*, 2010],

Johnson and Johnson [Gong and Zinser, 2013] и другие (данные по патентам до 2013 года представлены на рис. 1). Благодаря чему достигнут значительный клинический прогресс в использовании дейтерированных лекарств [Tung, 2016]. В 2017 году Управление по контролю за продуктами и лекарствами США (FDA) приняло заявку на лекарственный препарат (NDA) SD-809 (Austedo ®) [Mullard, 2017] для лечения хореи, связанной с развитием болезни Хантингтона, на основании успешных клинических испытаний III фазы. SD-809 показывает схожую эффективность с тетрабеназином в более низких дозах и с большей продолжительностью действия; таким образом, режим дозирования был сокращен с трех раз в день до двух раз. Другие дейтерированные препараты, такие как СТР-499 (дейтерированный пентоксифиллин) [Sabounjian *et al.*, 2016; Braman *et al.*, 2013) и AVP-786 [Garay and Grossberg, 2017] (дейтерированный декстрометорфан), продемонстрировали *in vivo* улучшенные фармакокинетические свойства и в настоящее время находятся на стадии клинического исследования.



**Рисунок 1.** Динамика подачи первых патентных заявок на дейтерированные препараты от крупных фармкомпаний [Timmins, 2014, с изменениями].

#### 1.4 Генетические эффекты дейтерия

История изучения влияния тяжелого изотопа водорода на живые организмы длится уже больше полувека и, несмотря на значительный прогресс в данной теме, исследований эффектов дейтерия на уровне генетических процессов пока недостаточно. В частности, есть данные, в которых 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.

P. Sestili с коллегами [2019] сравнивали различия в повреждении дейтерированной и недейтерированной ДНК вследствие окислительного стресса в культуре клеток Т-лимфобластного лейкоза человека линии Jurkat. Для этого авторы исследования обрабатывали клетки различными концентрациями дейтерированных нуклеозидов ([8-D], 2'-дезоксиаденозин (D-dA), [2', 2'' - D2] 2'-дезоксигуанозин (D-dG), и [метил-D3] тимидин (D-dT)) в течение 24 и более часов, необходимых для завершения одного клеточного цикла. При этом включение дейтерированных нуклеозидов в клетки анализировали с помощью ЯМР-спектроскопии. Дейтерированные клетки культуры линии Jurkat подвергали 30-ти минутной обработке несколькими концентрациями  $H_2O_2$  для индукции одноцепочечных разрывов ДНК. Степень повреждения ДНК оценивалась методом ДНК-комет. В результате обнаружено статистически значимое уменьшение степени повреждения ДНК в клетках с включением дейтерированных нуклеозидов при обработке наибольшей из тестируемых концентрацией (50 мкМ) перекиси водорода. Порядок эффективности дейтерированных нуклеозидов, т.е. зависимость степени повреждения ДНК от концентрации нуклеозида, составил  $D-dG > D-dT > D-dA$ , где D-dG проявлял наибольшую эффективность при минимальной концентрации 50 мкМ. Также показано, что геномные дейтерированные нуклеотиды, включенные в ядерную ДНК, не влияют на активность или эффективность механизмов репарации ДНК при устранении одноцепочечных разрывов ДНК, вызванных окислительным стрессом.

Эффект оксида дейтерия исследовался в контексте его влияния на экспрессию гена *GFP in vitro* на неклеточной экспрессионной системе генов, включающей очищенные компоненты *E. coli* и РНК-полимеразы T7, с заменой H<sub>2</sub>O на D<sub>2</sub>O в диапазоне концентраций 0 – 60% и добавлением фиксированного количества плазмидной ДНК, кодирующей GFP белок [Hohlefelder *et al.*, 2013]. Экспрессия GFP оценивалась количественно в зависимости от времени инкубации, уровень экспрессии был тем меньше, чем выше доза D<sub>2</sub>O. Для определения, на каком уровне оксид дейтерия влияет на экспрессию белка GFP, на описанной выше экспрессионной системе были отдельно исследованы процессы транскрипции, трансляции и холдинга белка. Было обнаружено, что D<sub>2</sub>O значительно повышает экспрессию *GFP* на уровне транскрипции, но действует как супрессор при трансляции и созревании белка, при этом эффект линейно зависел от дозы оксида дейтерия. При концентрации D<sub>2</sub>O 60% уровень экспрессии GFP снизился и составил 40% от уровня экспрессии контрольного образца.

Влияние нехватки дейтерия в организме на экспрессию генов *c-myc*, *Ha-ras* и *p53* изучали на чувствительной линии мышей CBA/Ca [Gyöngyi and Somlyai, 2000]. Контрольная группа выпаивалась обычной водопроводной водой (содержание D 150 ppm±3ppm), исследуемая группа – водой с пониженным содержанием дейтерия (21ppm±3ppm). Животным однократно вводили канцероген 7,12-диметилтетрафен и через 48 часов после введения анализировали экспрессию генов. Было обнаружено, что экспрессия всех исследованных генов ингибировалась в шести различных органах (селезенке, легких, тимусе, почках, печени и лимфатических узлах) в группе мышей, которые пили воду обедненную дейтерием. Авторы предположили, что гены, играющие ключевую роль в регуляции клеточного цикла и развитии опухолей, чувствительны к уменьшению концентрации дейтерия в организме. Позднее теми же авторами в расширенном коллективе [Gyöngyi *et al.*, 2013] проведён анализ экспрессии генов *Bcl2*, *Kras* и *Myc* в легких мышей линии CBA/Ca. Животные были разделены на контрольную и

экспериментальную группы по принципу предыдущей работы и выпаивались обычной или обедненной дейтерием водой за 7 дней до введения канцерогена и в течение 24 часов после, до исследования уровня экспрессии протоонкогенов. Таким образом, в группе мышей, принимавших воду с пониженным содержанием D, среди самок зафиксировано значимое снижение экспрессии всех исследуемых генов.

Обедненная дейтерием вода рассматривалась в качестве модифицирующего фактора при исследовании влияния масел *Mentha longifolia* L. [Rasooli *et al.*, 2019] и *Rosa Damascena* Mill. [Fatemi *et al.*, 2020] на воспалительные процессы у крыс Wistar с моделированным сепсисом. Животные получали в качестве питья воду с пониженным содержанием дейтерия (15 ppm и 30 ppm) в течение 2-ух недель. Далее через 24 часа после операции анализировался уровень экспрессии гена *COX2* (циклооксигеназа-2) в клетках печени крыс, а также проводились гистологические и биохимические исследования. Наблюдалось значимое понижение уровня экспрессии гена *COX2* в группах животных с недостатком дейтерия относительно контрольной группы. В данных же группах зафиксировано снижение показателей повреждения печени и окислительного стресса, демонстрируя синергидный эффект с тестируемыми маслами.

В работах по изучению влияния тяжелой воды или, напротив, воды с пониженным содержанием дейтерия, возникает изменение градиента D/H в жидкостях организма, что и влечет за собой биологические эффекты на разных уровнях. Градиент  $D_{\text{слюны}} \gg D_{\text{плазмы крови}} > D_{\text{грудного молока}}$  значительно уменьшался во время потребление воды с пониженным содержанием дейтерия [Dzhimak *et al.*, 2015]. Замена дейтерия на водород изменяла градиент  $D_{\text{плазмы крови}} > D_{\text{висцеральных органов}}$  на  $D_{\text{плазмы крови}} \ll D_{\text{висцеральных органов}}$ , увеличивая индивидуальную адаптацию к изотопному шоку [Basov *et al.*, 2019]. Применение активно разрабатываемых в настоящее время дейтерированных препаратов или использование воды с пониженным содержанием дейтерия в рамках адьювантной противоопухолевой терапии,

вероятно, приведут к подобным эффектам в организме человека, смещая изотопные градиенты, влияя на биохимические, клеточные и генетические процессы. Это показывает актуальность исследования влияния дейтерия на биологические системы, в том числе, и исследование его генетических эффектов.

### 1.5 SOS-ответ у *Escherichia coli*

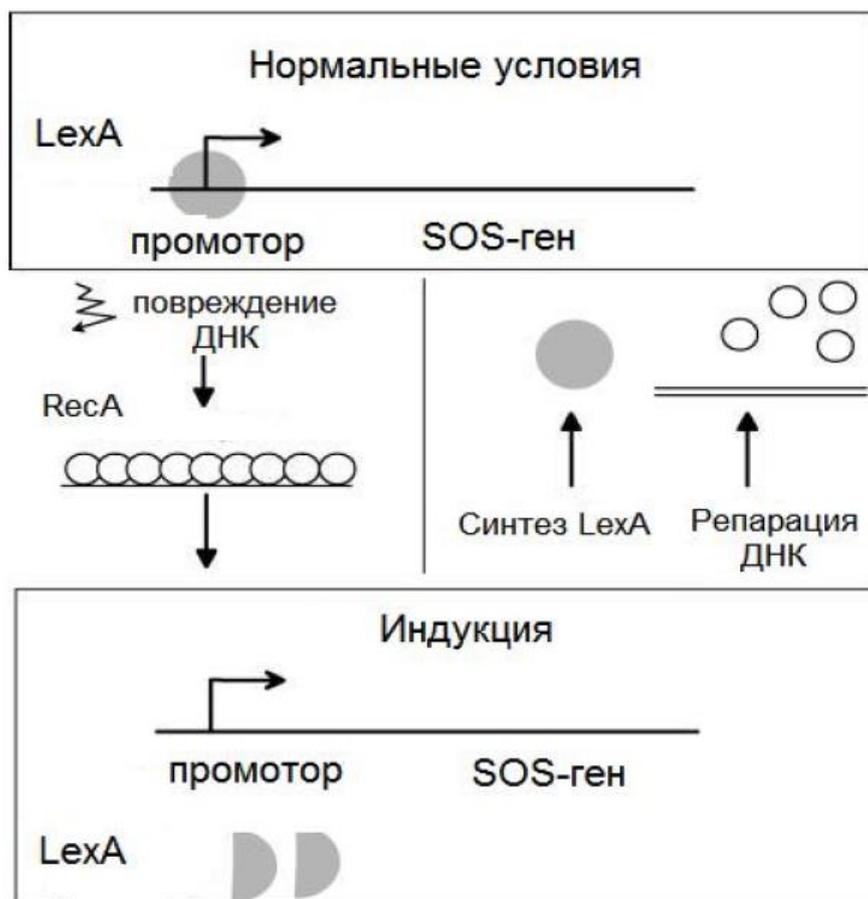
SOS-ответ у *E. coli* индуцируется накоплением одноцепочечных разрывов ДНК при воздействии УФ-излучения и различных химических агентов [Radman, 1974; Fernandez de Henestrosa *et al.*, 2000; Michel, 2005]. Он влечет за собой повышение экспрессии более 50 генов, которые выполняют разнообразные функции в ответ на повреждение ДНК, в том числе реализуют эксцизионную репарацию, гомологичную рекомбинацию, синтез ДНК, склонный к ошибкам. Не все гены, принадлежащие SOS-регулону, индуцируются одновременно и на одном уровне. Ответ точно синхронизирован и зависит от количества повреждений и времени, прошедшего с момента их обнаружения; избирательная экспрессия некоторых генов может возникнуть в ответ на даже незначительное эндогенное повреждение ДНК, в то время как другие гены будут экспрессироваться только при резком повреждении ДНК и постоянном наличии индуцирующего сигнала [Fernández De Henestrosa *et al.*, 2000; Courcelle *et al.*, 2001; Quillardet *et al.*, 2003].

По порядку индукции все гены SOS-регулона можно разделить на три фазы. На первом этапе SOS-ответа экспрессируются гены эксцизионной репарации (*uvrABD*) и гены *ruvAB*, отвечающие за рекомбинационную репарацию ДНК. Здесь же экспрессируется ДНК-полимераза II (ген *polB*) для синтеза ДНК при блокированной репликационной вилке [Rangarajan *et al.*, 1999] и склонная к ошибкам ДНК-полимераза IV, кодируемая геном *dinB*. Также в первой фазе SOS-ответа индуцируется ген *dinI*, продукт которого ингибирует процессинг белка UmiD, т.е. блокирует репарацию склонную к ошибкам [Kuzminov, 1999]. На втором этапе происходит синтез белков RecA

и RecN, участвующих в рекомбинационной репарации [Kowalezukowski *et al.*, 1994]. В последнюю фазу SOS-ответа экспрессируется ген *sulA*, кодирующий ингибитор клеточных делений, обеспечивающий клетке время для завершения репарации. Если же повреждения ДНК были обширными и ещё остаются после первых этапов SOS-ответа, индуцируется синтез склонной к ошибкам ДНК-полимеразы V, или мутасомы, продукта генов *umuC* и *umuD*, которая вызывает повышенный уровень мутаций [Courcelle *et al.*, 2001; Henrikus *et al.*, 2018]. В последнюю очередь экспрессируются гены колицинов, ответственные за бактериальный апоптоз и ведущие к лизису клетки [Tang *et al.*, 1999; Tippin, 2004].

Два белка играют ключевую роль в регуляции SOS-ответа: LexA и RecA белки (рис.2). Первый из них, продукт гена *lexA*, состоит из двух доменов, N-концевого ДНК-связывающего домена (NTD) и C-концевого каталитического домена (CTD) с серин-лизиновой каталитической диадой, разделенных коротким гибким линкером. CTD также отвечает за гомодимеризацию белка LexA [Luo *et al.*, 2001; Zhang *et al.*, 2010]. Во время нормального роста бактерий, димер LexA действует как репрессор транскрипции генов, принадлежащих к SOS-регулону, путем связывания со специфичной последовательностью в промотерных областях [Walker, 1984]. Эти последовательности называются SOS-боксами и представляют палиндромную последовательность 5'-TACTGTATATATACAGTA-3' [Lewis, 1994]. Белок RecA действует как копротеаза для стимулирования расщепления LexA, а также других родственных белков, таких как фаговые репрессоры ( $\lambda$ ,  $\phi$ 80, P22, 434), белок UmuD и его гомологи [Walker, 1984]. RecA в присутствии АТФ связывает одноцепочечную ДНК (ssDNA) и превращается в активированную форму, образуя нуклеопротеиновые филаменты RecA/ssDNA [Patel *et al.*, 2010; Goodman *et al.*, 2016; Jaszczur *et al.*, 2016]. Активированная форма RecA инициирует аутопротеолиз LexA в области пептидной связи Ala<sup>84</sup>-Gly<sup>85</sup> возле середины белка, тем самым деактивируя последний [Little, 1991], снижая его сродство к ДНК [Neher *et*

*al.*, 2003]. В результате пул LexA белка начинает уменьшаться, что приводит к экспрессии SOS-генов [Little and Mount, 1982].



**Рисунок 2.** Схема индукции Sos-ответа [Ушаков, 2019].

Уровень, сроки и продолжительность индукции LexA-регулируемых генов различны и зависят от силы SOS-боксов, их количества, местоположения и силы промоторов генов. Отклонение SOS-бокса от консенсусной последовательности TACTG(TA)<sub>5</sub>CAGTA характеризуется индексом гетерологии. Чем он выше, тем ниже сродство репрессора LexA к последовательности [Lewis *et al.*, 1994; Fernández De Henestrosa *et al.*, 2000]. Благодаря этому достигается точная синхронизация фаз SOS-ответа, обеспечивая разный уровень и время экспрессии генов SOS-регулона.

В то же время, сам ген *lexA* также является SOS-геном. Постоянное производство белка LexA во время SOS-ответа обеспечивает возможность

белку повторно накапливаться и подавлять SOS-гены, как только происходит восстановление ДНК, и индуцирующий сигнал исчезает [Walker, 1984].

### 1.5.1 Ген *recA*

Первым секвенированным геном SOS-ответа у бактерий *E.coli* был ген *recA*. В неиндуцированной клетке его экспрессия достигает примерно 7000 молекул белка RecA [Sassanfar and Roberts, 1990]. При повреждении ДНК экспрессия увеличивается в 50 раз [Horii *et al.*, 1980; Karu *et al.*, 1982]. Ген был идентифицирован в 1965 году при генетическом отборе мутантных бактерии неспособных к рекомбинации с донорным штаммом Hfr [Clark and Margulie, 1965]. Последующий генетический анализ показал, что продукт гена *recA* необходим для RecBCD- и RecF-путей гомологичной рекомбинации. Мутанты *recA* были крайне чувствительны к ДНК-повреждениям. Они росли с низкой скоростью, при этом доля жизнеспособных клеток в культурах достигала 50% [Capaldo *et al.*, 1974]. Бактерии дикого типа в ответ на ингибирование синтеза ДНК останавливают своё деление, но мутанты *recA* продолжали делиться, образуя нежизнеспособные клетки. Следовательно, белок RecA участвует в задержке клеточного деления через индукцию SOS-системы [Inouye, 1971]. Вообще мутации данного гена оказались чрезвычайно плеiotропны, влияя на целый ряд клеточных процессов: на репарацию ДНК, SOS-мутагенез, индукцию  $\lambda$ -профага, деление клеток и хромосомную сегрегацию [Kowalczykowski *et al.*, 1994] Спустя десятилетие после открытия гена, кодируемый им белок был впервые очищен, и сообщалось о широком спектре его биохимических активностей, включая связывание ДНК, трансактивацию аутопротеолиза репрессоров LexA и  $\lambda$ -фага, гидролиз АТФ, способность образовывать филаменты на ДНК и участвовать в обмене гомологичными цепями ДНК [McEntee *et al.*, 1976; Kuzminov, 1999]. Гомологи белка RecA широко распространены в разных видах от бактерий до человека, например, человеческий гомолог представлен белком RAD51 [Roca and Cox, 1990; Cox, 2007a].

Белок RecA имеет молекулярную массу 38кДа, состоит из трех доменов: N-концевого, большого центрального домена и C-концевого. Центральный домен имеет структурное сходство с рядом других белков (моторные белки, хеликазы), состоит из восьми  $\beta$ -структур, связанных  $\alpha$ -спиралью, и содержит ДНК-связывающий и АТФ-связывающий сайты [Story and Steitz, 1992a, b]. C-концевой домен действует как ауторегулятор функций белка RecA. При его отсутствии активность RecA становится более выраженной, что делает его вероятным местом взаимодействия с другими белками, модулирующими функцию белка RecA [Cox, 2007a]. N-концевой и центральный домены участвуют в образовании RecA-полимера.

Для активации рекомбиназной и копротеазной функций белка RecA требуется наличие одноцепочечных разрывов ДНК и аденозинтрифосфата (АТФ) [Craig and Roberts, 1981; Shibata *et al.*, 1981]. Гидролиз АТФ необходим для диссоциации и протягивания филамента, образованного на ssDNA, на двуцепочечную область, но не нужен для сборки RecA филаментов [Cox, 2007b].

Нуклеотидсвязывающий сайт нуклеопротеидной нити RecA расположен на границе раздела двух мономеров RecA [Chen *et al.*, 2008], поэтому требуется димер RecA для сборки филамента RecA на ssDNA с последующим удлинением нити путем добавления мономеров. Рост филамента происходит двунаправлено, но предпочтение отдается 5'-3' направлению [Bell *et al.*, 2012, Bell and Kowalczykowski, 2016]. С помощью электронной микроскопии было показано существование двух конформаций нуклеопротеидной нити RecA: растянутое состояние (один мономер на каждые четыре нуклеотида ДНК), сформированное на ДНК в присутствии АТФ или аналога АТФ и сжатое, образующееся в отсутствие АТФ [Egelman and Stasiak, 1993]. Эффективное формирование RecA филамента в растянутой конформации необходимо для SOS-индукции, хотя гидролиз АТФ, как указывалось выше, для этого не нужен [Gruenig *et al.*, 2009].

### 1.5.2 Ген *dinI*

Ген *dinI* был впервые идентифицирован Дэвидом Маунтом и его коллегами [Lewis *et al.*, 1994] как хромосомный локус, имеющий высокое сродство к оператору репрессора LexA. Позднее данный ген был определен в качестве мультикопийного супрессора у чувствительных к холоду бактерий с мутацией *dinD68*, мутантный аллель которых способствовал индукции SOS-ответа при температуре ниже 20°C в отсутствии каких-либо ДНК-повреждающих агентов [Yasuda *et al.*, 1996]. Сверхэкспрессия гена *dinI* с мультикопийной плазмиды усиливала чувствительность клеток к УФ и подавляла индукцию SOS-ответа на митомицин С [Yasuda *et al.*, 1998]. Позже было высказано предположение, что при нормальном уровне экспрессии белка DinI, он будет препятствовать расщеплению UmuD и ограничивать SOS-мутагенез, оказывая небольшое влияние на расщепление LexA [Craig and Roberts, 1981].

Очищенный белок DinI (81 аминокислотный остаток) взаимодействует как с активными, так и неактивными формами белка RecA [Voloshin *et al.*, 2001; Yasuda *et al.*, 2001]. При этом действие белка зависит от его концентрации. При высоких концентрациях белок DinI выступает как негативный регулятор SOS-ответа в *Escherichia coli*. Физическое взаимодействие DinI с RecA предотвращает связывание последнего с одноцепочечной ДНК, что необходимо для активации RecA, а также, белок DinI вытесняет ssDNA из стабильного кофиламента RecA/ДНК, устраняя тем самым SOS-сигнал. Кроме того, DinI ингибирует опосредованное RecA гомологичное спаривание ДНК, но не имеет влияние на активно протекающий обмен нитей [Yasuda *et al.*, 1998, 2001]. При концентрациях стехиометрически равных концентрации белка RecA, он выступает в качестве положительного модулятора функции белка RecA, стабилизируя RecA филламент [Lusetti *et al.*, 2004 a, b].

Предполагается, что отрицательно заряженная С-концевая спираль белка DinI может конкурировать с ssDNA за связывание с петлей L2 в белке

RecA, вытесняя ssDNA из нуклеопротеиновой нити RecA и ингибируя реакцию обмена нитей [Voloshin *et al.*, 2001]. Удаление 17 аминокислот C-концевого домена RecA оказывает существенное влияние на взаимодействие белков RecA и DinI [Lusetti *et al.*, 2004b], это изменяет сродство последнего к RecA-филламенту. В отличие от RecA дикого типа, RecA $\Delta$ C17 демонстрировал сниженную активность обмена нитей в присутствии DinI [Galkin *et al.*, 2011].

DinI не обнаруживается во время нормального роста бактерий, его экспрессия индуцируется повреждением ДНК и регулируется белками LexA и RecA [Yasuda *et al.*, 1998; Voloshin *et al.*, 2001]. Ген экспрессируется на первом этапе SOS-ответа, в это время синтезируется некоторое количество UmuD, но его протеолиз до активного состояния UmuD' блокируется белком DinI, что предотвращает запуск мутагенеза в начале SOS-репарации [Janion, 2008]. Роль DinI как понижающего регулятора реакции SOS-ответа также подтверждается наблюдением, что максимальное связывание белка с RecA-филламентами происходит на более поздних этапах SOS-ответа [Voloshin *et al.*, 2001].

### 1.5.3 Колицины

Колицины, кодируемые плазмидами антибактериальные цитотоксины *E. coli*,. которые выделяются в окружающую среду и поражают чувствительные штаммы конкурирующих бактерий. Синтез колицинов смертелен для продуцирующей клетки и подавляется во время нормального роста за счет транскрипционного фактора LexA, главного репрессора SOS-ответа [Cascales *et al.*, 2007, Ebina *et al.*, 1982]. При индукции SOS-регулона в первую очередь экспрессируются гены репарации [Courcelle *et al.*, 2001], но индукция большинства генов колицина задерживается и запускается только при серьезном и стойком повреждении ДНК [Salles *et al.*, 1987, Herschman and Helinski, 1967]. Это обусловлено функцией колицинов, т.к. они не задействованы в восстановлении ДНК, а вскоре после их синтеза клетка-продуцент умирает, их возможная роль состоит в том, чтобы помочь

выжившим клеткам, уничтожая потенциальных конкурентов [Majeed *et al.*, 2011].

Колицины по механизму повреждающего действия можно разделить на две основные группы: нуклеазы, активные в цитоплазме (РНКаза или ДНКаза), и колицины, образующие поры во внутренней мембране [James *et al.*, 1996; Pugsley, 1984]. Большинство из данных цитотоксинов демонстрируют схожую организацию функциональных доменов: N-концевая часть, необходимая для переноса через внешнюю мембрану, центральная область, предназначенная для связывания с рецептором на поверхности клетки, и C-концевой домен, определяющий летальную функцию [Lazdunski *et al.*, 1998]. Два колицина-рибонуклеазы, E3 и DF13, имеют сходный C-концевой каталитический домен, который расщепляет 16S рибосомную РНК и тем самым инактивирует рибосому [Boon, 1971; De Graaf *et al.*, 1973]. Другие типы колицинов- РНКаза, E5 и D, гидролизуют транспортную РНК: колицин E5 атакует изоакцепторные тРНК для Tyr, His, Asn и Asp, которые содержат модифицированное основание Queuine (7-(3,4-транс-4,5-цис-дигидрокси-1-циклопентен-3-иламинометил)-7-дезагуанин) в неоднозначных позициях каждого антикодона [Ogawa *et al.*, 1999], а колицин D в свою очередь гидролизует четыре изоакцептора аргинина [Tomita *et al.*, 2000].

Нуклеазные формы колицинов (E2 – E9 и D) образуют плотный (1:1 молярный) гетеродимерный комплекс с родственным им белком иммунитета. Это взаимодействие защищает колициногенные клетки от эндогенных и экзогенных молекул колицина [Kleanthous *et al.*, 1998; Masaki and Ohta, 1985]. В случае колицина D, токсин и белок иммунитета кодируются соответственно генами *cda* и *cdi*, которые образуют оперон в плазмиде pColD [Frey *et al.*, 1986]. Их общий SOS-промотор индуцируется повреждением ДНК, так что экспрессия обоих белков усиливается одновременно. В отсутствие индукции ген *cdi*, кодирующий белок иммунитета, экспрессируется на базальном уровне с его собственного промотора,

обеспечивая тем самым иммунитет против экзогенного колицина D [Roos *et al.*, 1989].

### 1.6 *ada*-регулон

В репарации ДНК *ada*-регулон представляет собой набор генов, экспрессия которых важна для адаптивного ответа и запускается в прокариотических клетках под действием сублетальных доз алкилирующих агентов. Адаптивный ответ *Escherichia coli* на алкилирующее повреждение ДНК регулируется белком Ada. Данный ответ защищает клетки от мутагенного и цитотоксического действия алкилирующих агентов, присутствующих в окружающей среде и от реактивных эндогенных метаболитов [Samson, Cairns, 1988; Jeggo, 1988; Sedgwick *et al.*, 2007]. Что позволяет клеткам переносить их эффекты, которые обычно токсичны и мутагенны. Ответ *ada*-регулона включает в себя экспрессию четырех генов: *ada*, *alkA*, *alkB* и *aidB* (гены *ada* и *alkB* составляют один оперон) [Lindahl *et al.*, 1988]. При этом продукт гена *ada*, белок Ada, является активатором транскрипции всех четырех генов регулона.

Алкилирующие соединения – это вещества из группы мутагенов и канцерогенов, которые модифицируют ДНК путем алкилирования. Повреждения ДНК на основе алкилированных оснований способны останавливать репликацию, прерывать транскрипцию, замедлять деление клеток или запускать апоптоз. У млекопитающих такие повреждения могут быть вовлечены в канцерогенез, в развитие нейродегенеративных заболеваний и процессов старения. Алкилирующие агенты вносят метильные или этильные группы на все доступные атомы азота и кислорода в основаниях ДНК, обеспечивая ряд поражений.

В адаптивном ответе у *E. coli* ключевую роль играет белок Ada, которому присущи две функции: репарационная, заключающаяся в репарации O<sub>6</sub>-алкилгуанина и O<sub>4</sub>-метилтимина, и регуляторная, усиление транскрипции генов *ada*-регулона (*ada*, *alkA*, *alkB* и *aid.*) Белок Ada состоит из двух основных доменов: С-концевого домена (C-Ada) и N-концевого

домена (N-Ada), связанных шарнирной областью, чувствительной к протеолитическому расщеплению. Репарационная активность белка Ada связана с этими двумя доменами: цистеин, активированный цинком, домена N-Ada переносит метил на свой цистеиновый остаток Cys38 с фосфатного остатка ДНК, а домен C-Ada переносит на свой Cys321 метил из O<sub>6</sub>-алкилгуанина [Sakumi *et al.*, 1993; Landini and Volkert, 2000; Mielecki *et al.*, 2014]. Домены могут функционировать независимо (рис.3).

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. Показано, что алкилирование N-Ada домена повышает его аффинность к ДНК от 100 до 1000 раз [Landini and Volkert, 2000; Mielecki *et al.*, 2014].

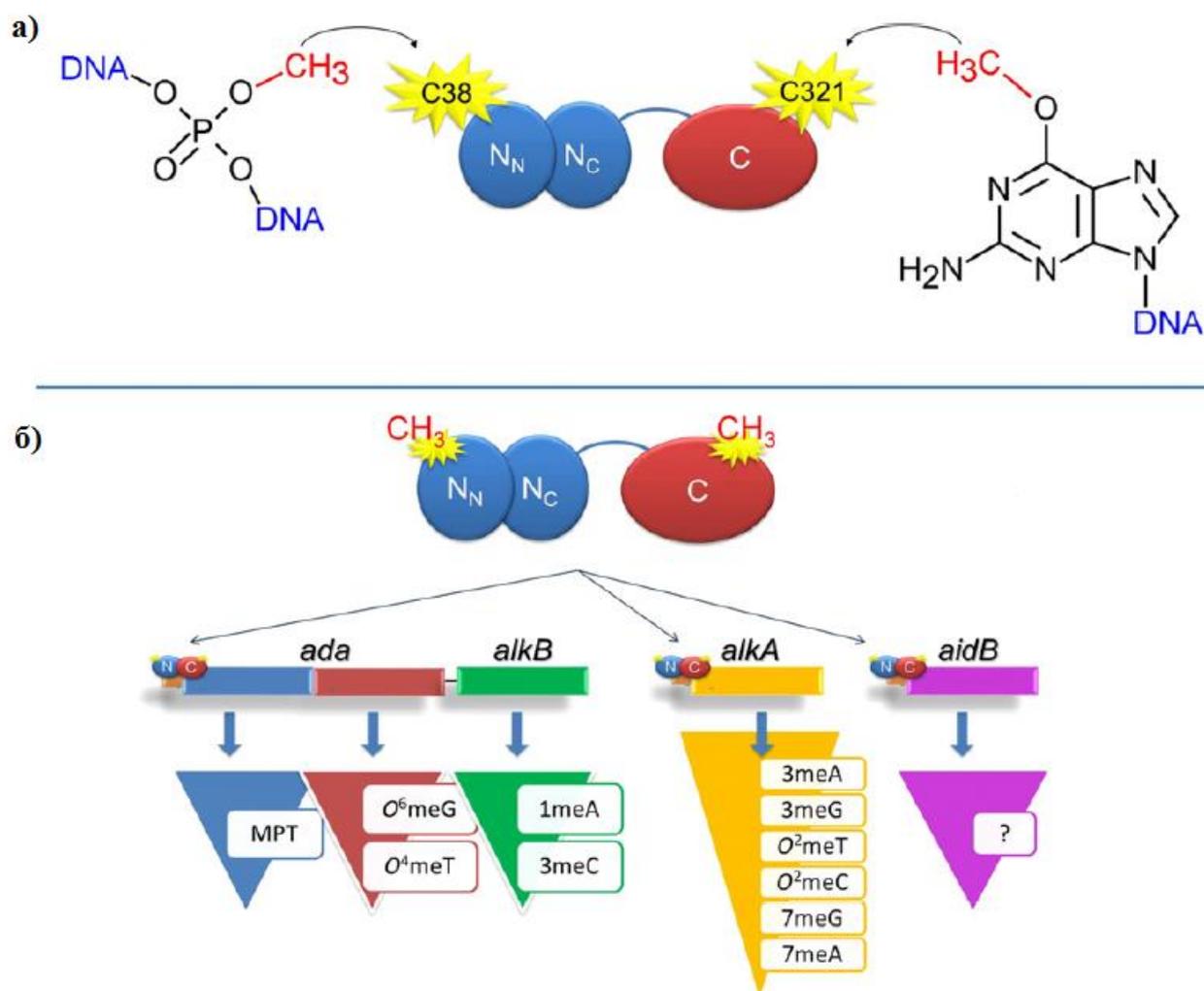
Ген *alkA* кодирует гликозилазу, которая восстанавливает различные повреждения, включая N<sub>7</sub>-метилгуанин, N<sub>3</sub>-метилпурины и O<sub>2</sub>-метилпиримидины. [Lindahl *et al.*, 1988]. Белок AlkA удаляет поврежденное основание из сахарофосфатного остова ДНК, разрывая гликозидную связь, прикрепляющую основание к сахару, создавая абазальный участок. Дальнейшая обработка абазального сайта происходит AP-эндонуклеазами и полимеразой I, затем лигаза завершает восстановление [Volkert, 1988].

Два других гена *ada*-регулона *alkB* и *aidB* также задействованы в адаптивном ответе *E. coli*. Белок AlkB использует  $\alpha$ -кетоглутарат / Fe (II) - зависимый механизм, который путем химического окисления удаляет алкильные повреждения из ДНК, обеспечивая таким образом защиту генома от алкилирования [Li *et al.*, 2010]. Предполагается, что продукт гена *aidB*, белок AidB, участвует в деградации эндогенных алкилирующих агентов [Landini *et al.*, 1994; Rohankhedkar *et al.*, 2006]. Показано, что белок AidB может связываться с двухцепочечной ДНК и участвовать в ее dealкилировании [Rohankhedkar *et al.*, 2006].

Белок Ada имеет два активных метильных акцептора, цистеиновых остатка, которые необходимы для деметилирования ДНК. Оба сайта могут метилироваться, когда белок Ada переносит метильную группу от соответствующего повреждения ДНК на себя. Эта реакция необратима, и метилированный Ada белок начинает действовать как активатор транскрипции. Решающую роль в инициации транскрипции играет  $\sigma$ -фактор РНК-полимеразы. Однако активация транскрипции *ada*-регулона происходит двумя различными способами. В случае генов *ada*, *alkB* и *aidB* N-Ada участвует в связывании ДНК и взаимодействует с РНК-полимеразой, тогда как метилированный С-Ada взаимодействует с субъединицей  $\sigma^{70}$  РНК-полимеразы. Хотя эти взаимодействия независимы, оба необходимы для активации транскрипции. При этом отрицательно заряженный набор аминокислот фактора  $\sigma^{70}$  является мишенью для Ada-активации генов *ada*, *alkB* и *aidB*, в то время как промотор гена *alkA* требует взаимодействия положительно заряженного кластера с белком Ada [Landini *et al.*, 1998; Landini and Busby, 1999]. Для промоторов *ada*, *alkB* и *aidB* необходима метилированная форма Ada белка для активации транскрипции, тогда как транскрипция с промотора *alkA* иницируется как неметилированной, так и метилированной формами [Landini and Volkert, 1995; Nakabeppu, Sekiguchi, 1986]. Наконец, С-концевой домен Ada, который необходим для активации на промоторах *ada* и *aidB*, необязателен в *alkA* [Akimaru *et al.*, 1990].

У человека гомологом продукта гена *ada* *E. coli* является фермент O<sub>6</sub>-метилгуанин-ДНК-метил-трансфераза (MGMT), который играет решающую роль в восстановлении первичных повреждений ДНК, вызванных алкилирующими цитостатиками (АЦ). MGMT переносит алкильную группу из O<sub>6</sub>-гуанина на собственный цистеиновый остаток, т.е. осуществляет прямое восстановление структуры ДНК и защищает клетку от цитотоксических и мутагенных эффектов АЦ. Однако при использовании АЦ для химиотерапии опухолей часто возникает устойчивость к ним вследствие индукции MGMT. Поэтому защитный эффект MGMT в нормальных клетках

становится неблагоприятным фактором при проведении химиотерапии опухолей с использованием АЦ [Gerson, 2004; Julsing and Peters, 2014; Sabharwal and Middleton, 2006]. В этой связи становится актуальной валидация тест-системы на индукцию гена *ada* у *E. coli* для оценки и прогнозирования способности новых потенциальных АЦ индуцировать у опухолевых клеток устойчивость к АЦ.

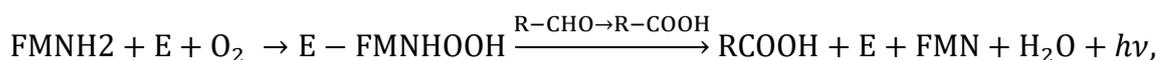


**Рисунок 3. а)** Репарационная функция белка Ada. **б)** Регуляторная функция белка Ada. Показаны ДНК-повреждения, репарируемые соответствующими белками *ada*-регулона (MPT – метилфосфотриэфиры, для белка *aidB* характерные мишени не подтверждены) [Mielecki and Grzesiuk, 2014, с изменениями].

## 1.7. Использование тест-систем на основе люминесцентных бактерий

Люминесцентные бактерии широко распространены в природе, чаще встречаются в морской среде: воде, отложениях, кишечнике морских животных, но есть и пресноводные или наземные виды. Свет, излучаемый люминесцентными бактериями, обеспечивается работой билюминесцентной системы, состоящей из люциферазы и комплекса оксидоредуктазы жирных кислот (редуктазы, синтазы и трансферазы).

Бактериальная люцифераза является флавинозависимой монооксигеназой, катализирующей окисление FMNH<sub>2</sub> и длинноцепочечного алифатического альдегида в присутствии O<sub>2</sub> до FMN, H<sub>2</sub>O и соответствующей жирной кислоты с испусканием кванта света в видимой области спектра [Inoue, 1994]:



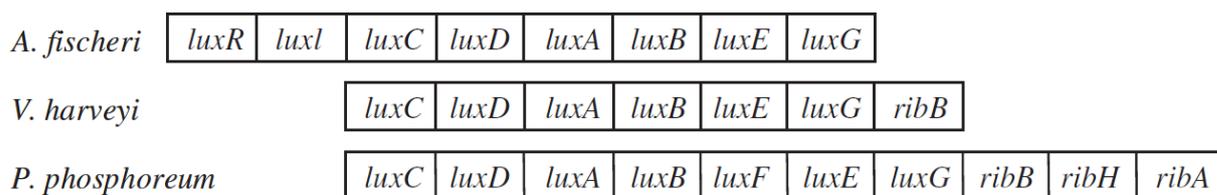
где E – люцифераза,

RCHO – алифатический альдегид,

R-COOH – жирная кислота, образующаяся при окислении альдегида.

Участвующий в люциферазной реакции альдегид образуется из соответствующей жирной кислоты под действием редуктазного комплекса. После окисления субстратов комплекс медленно распадается, высвобождая продукты.

Бактериальная люцифераза представляет собой гетеродимерный белок [Matheson and Lee, 1981]. Её субъединицы кодируют гены *luxA* и *luxB*, гены *luxCDE* кодируют комплекс ферментов восстановления жирных кислот, продукт гена *luxG* необходим для восстановления флавина. Гены объединены в *lux*-оперон [Meighen, 1991]. На рис. 4 представлены гены, обеспечивающие люминесценцию видов *Vibrio fischeri*, *Vibrio harveyi* и *Photobacterium phosphorium*, наиболее часто применяемых в тест-системах для анализа токсичности [Urbanczyk *et al.*, 2007].



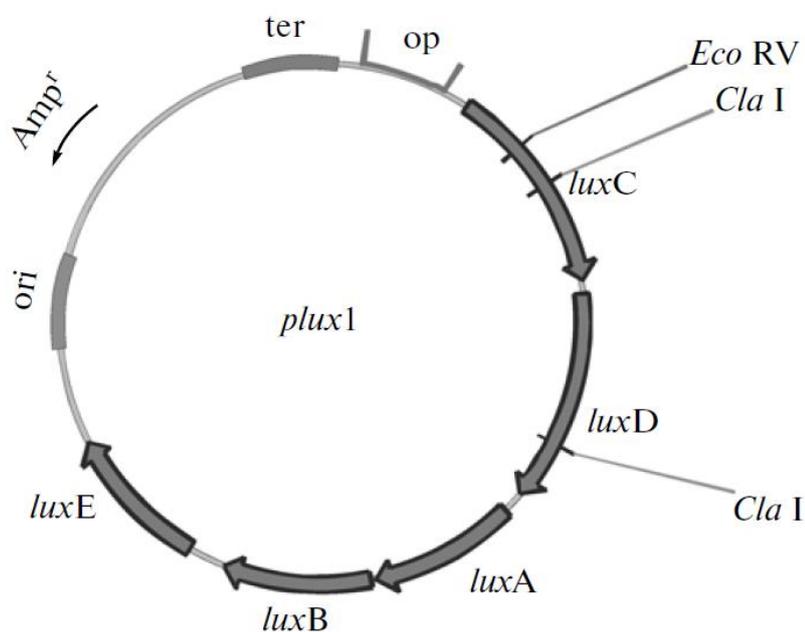
**Рисунок 4.** Lux-гены люминесцирующих бактерий [Ma *et al.*, 2014].

Анализ токсичности с участием lux-биосенсоров должен включать в себя источники люминесценции, реагирующие на специфические индукторы, и систему считывания люминесценции. В качестве lux-биосенсоров (источников люминесценции) могут использоваться природные люминесцентные бактерии *P. phosphoreum*, *Vibrio harveyi*, *V. fischeri* и др., специфические мутантные штаммы *V. harveyi* и *V. Fischeri*, или рекомбинантные штаммы, содержащие клонированные гены люциферазы. Lux-биосенсор в общем виде содержит сенсорный элемент (в мутантных и рекомбинантных штаммах это индуцибельные промоторы) и репортерный элемент (в рекомбинантных бактериях - беспромоторный транспозон *luxCDABE*).

На основе фотобактерий создан ряд коммерческих тест-систем: Microtox (Azur Enviromental, США) [Lee *et al.*, 2005] на основе *Vibrio fischeri*, Toxalert (Merck, США) - *Photobacterium phosphoreum* [Bulich, 1979], Vitotox (GENAUR Molecular Products, Бельгия)- *Vibrio fisecheri* [Verschaeve *et al.*, 1999] и др. Тест-системы используются в контроле загрязнения окружающей среды, простота в использовании и экспрессность методов позволят проводить анализ с минимальными затратами и даже в полевых условиях. Однако эти системы имеют и ряд ограничений, например, температурные ограничения проведения анализа, наличие осмопротектора у тест-систем на основе морских бактерий, отсутствие возможности для одновременного тестирования массива проб.

В последнее время широко используются рекомбинантные штаммы *E. coli*, содержащие *luxCDABE* оперон под индуцибельными промоторами для

специфической детекции ДНК-повреждающих агентов химической и физической природы [Lee *et al.*, 2005; Heitzer *et al.*, 1994; Van Dyk *et al.*, 1994].



**Рисунок 5.** Пример гибридной плазмиды lux-биосенсора [Завильгельский и др., 2012].

Для обнаружения агентов, способных индуцировать в клетке окислительный стресс, были созданы два биосенсора на основе штамма *E. coli* K12 MG1655 с гибридными плазмидами pKatG и pSoxS, рекомбинантные плазмиды которых несут lux-оперон люминесцирующей бактерии *Photorhabdus luminescens*, слитый с промоторами генов каталазы и супероксиддисмутазы, соответственно [Котова и др., 2009]. Белок-активатор ОхуR промотора гена *katG* специфически реагирует на перекись водорода и другие пероксиды, тогда как белок-активатор SoxR промотора *soxS* специфически реагирует на супероксид анион-радикал. Кроме этого, предложены lux-биосенсоры для детекции теплового шока, они несут lux-оперон под индуцируемыми промоторами генов *grpE* и *ibpA*, экспрессию которых индуцируют повышенная температура и, в меньшей степени, вещества: этанол, фенол, перекись водорода, азид натрия и другие [Котова и др., 2009]. Для изучения генотоксичности химических факторов среды применяют бактериальные lux-биосенсоры *E. coli* MG1655 (pRecA::*lux*) и *E.*

*coli* MG1655 (pColD::*lux*), сконструированные по тому же принципу, что и указанные выше штаммы, где *lux*-оперон поставлен под контроль промоторов генов *recA* и *cda* (*colD*), соответственно. В этом случае генотоксичность обнаруживается как результат активации SOS-системы у *E. coli* (рис.5).

Сконструированы высокочувствительные специфические *lux*-биосенсоры на основе бактерий *E. coli* для детекции ионов металлов и металлоидов, а также алкилирующих агентов [Завильгельский и др., 2012]. Бактерии содержат гибридные плазмиды pArsR'::*lux*, pMerR'::*lux*, pCopA'::*lux*, pAlkA'::*lux*, в которых транскрипция генов-репортеров *luxCDABE* *Photorhabdus luminescens* осуществляется с индуцируемых промоторов: *ars*-оперона (индукция ионами мышьяка и сурьмы), *mer*-оперона (индукция ионами ртути и кадмия), гена *copA* (индукция ионами серебра и меди) и гена *alkA* (индукция алкилирующими веществами), соответственно.

Для обнаружения антибиотиков в продуктах питания предложены *lux*-биосенсоры, специфически реагирующие на антибиотики тетрациклинового ряда - *E. coli* MG1655Z1 (pTetA'::*lux*),  $\beta$ -лактамного ряда - *E. coli* MG1655 *ampC*::*kan<sup>r</sup>* (pAmpC'::*lux*), на антибиотики хинолиновой группы - *E. coli* MG1655 (pColD'::*lux*) и аминогликозиды - *E. coli* MG1655 (pIbpA'::*lux*) [Котова и др., 2014]. Была показана высокая специфичность данных штаммов на указанные группы антибиотиков.

*Lux*-биосенсоры на основе рекомбинантных штаммов широко используются для детекции загрязнения природных вод [Сазыкина и др., 2010; Сазыкина и др., 2011], окружающей среды [Омельченко и др., 2011; Кудеевская и др., 2015] и почвы [Сазыкина и др., 2012]. Использование *lux*-биосенсоров для масштабного мониторинга позволяет экономить время на анализ, уменьшает материальные затраты и требует минимального оборудования для считывания люминесценции, что, несомненно, делает данный метод востребованным при необходимости оценки большого

количества проб и выгодно его выделяет при сравнении с классическими методиками.

## ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

### 2.1 Обоснование выбора штаммов

В генетической токсикологии для выявления и оценки мутагенной активности химических факторов на первом этапе тестирования, в процессе скрининга, используются бактериальные тест-системы и клеточные культуры. Вещества, проявившие активность на данном этапе, на следующем – тестируются *in vivo* на способность индуцировать микроядра или хромосомные aberrации в клетках костного мозга мышей или крыс [Абилев и Глазер, 2013]. Для первичной оценки мутагенной активности химических соединений применяют тест Эймса *Salmonella*/микросомы [McCann *et al.*, 1975] который включает в себя тест-систему из пяти штаммов *S. Typhimurium*, ауксотрофных по гистидину и ревертирующих к дикому типу в результате индукции обратных мутаций. Они позволяют устанавливать вероятные механизмы мутагенного действия тестируемых соединений. Большое количество штаммов, временные и ресурсные затраты являются ограничивающими факторами применения теста Эймса для скрининга массива химических соединений.

Для изучения генотоксичности химических и физических факторов в настоящее время широко применяют бактериальные lux-биосенсоры, содержащие гибридные плазмиды, в состав которых встроены регуляторные участки (промотор и оператор) генов, а также lux-оперон люминесцирующей бактерии в качестве репортера [Vollmer *et al.*, 1997; Davidov *et al.*, 2000; Norman *et al.*, 2005; Manukhov *et al.*, 2007; Song *et al.*, 2009; Котова и др., 2009; Завильгельский и др., 2012; Ahn *et al.*, 2009]. В этом случае генотоксичность обнаруживается как результат активации экспрессии генов *E. coli*, чувствительных к воздействию специфического индуктора. При изучении с помощью lux-биосенсоров 47 химических соединений (главным образом фармакологических средств) 16 из них индуцировали SOS-ответ, а 6 – окислительный стресс [Иголина и др., 2016]. Сравнение полученных

результатов с ранее опубликованными данными о мутагенной активности этих веществ в тесте Эймса показало полное совпадение результатов для 42 веществ. Это указывает на то, что lux-биосенсоры могут быть успешно использованы для выявления генотоксичных агентов при скрининге больших массивов химических соединений, а также для мониторинга образцов воды, аэрозолей воздуха и других компонентов окружающей среды.

При люминесцентном анализе регистрация ответа происходит по свечению бактерий, не требуя дополнительных манипуляций. Непосредственный анализ люминесценции бактерий позволяет одновременно регистрировать зависимость SOS-ответа как от концентрации тестируемого соединения, так и от продолжительности инкубирования культуры с исследуемым соединением. При этом lux-тест легко поддается автоматизации.

Для изучения генотоксичности химических агентов среды используют lux-биосенсоры *E. coli* MG1655 (pRecA::lux) и *E. coli* MG1655 (pColD::lux). У каждого из них свои преимущества и недостатки. Например, у *E. coli* MG1655 (pColD::lux) для генетического мониторинга загрязнений окружающей среды недостает чувствительности к низким концентрациям генотоксиканта. Биосенсор *E. coli* MG1655 (pRecA::lux) характеризуется высоким уровнем спонтанной люминесценции, связанной с частичной открытостью промотора pRecA. Это снижает амплитуду ответа, необходимого для достоверной регистрации индуцированного SOS-ответа. В этой связи в данной работе для изучения совместного действия оксида дейтерия и используемых индукторов на SOS-ответ использовалась тест-система из 3 штаммов - *E. coli* MG1655 (pRecA::lux), *E. coli* MG1655 (pColD::lux), *E. coli* MG1655 (pDinI::lux) и биосенсор *E. coli* MG1655 (pAlkA::lux) для анализа экспрессии генов *ada*-регулона в ответ на действие D<sub>2</sub>O и генотоксикантов. Биосенсор *E. coli* MG1655 (pDinI::lux) используется для скрининга и включен в тест-систему впервые в рамках данной работы.

## 2.2 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 PAlkA. Биосенсоры предоставлены Г.Б. Завильгельским и А.В. Мануховым (ГосНИИгенетика, г. Москва).

## 2.3 Обоснование выбора индукторов

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

1. Алкилирующие вещества (метилметансульфонат (ММС), N-нитрозо-N-метилмочевина (НММ), стрептозотоцин) - 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 *цис*-платина), 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 однонитевым 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 – митомицин С, *цис*-платина, стрептозотоцин 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.

## 2.4 Индукторы

Все тестируемые химические соединения были аналитической чистоты. Митомицин С, *цис*-платина (цис-диаминодихлорплатина (II)), 4-НХО (4-нитрохинолин-1-оксид), НММ (N-нитрозо-N-метилмочевина), ММС (метилметансульфонат), стрептозотоцин, 2-аминопурин, 5-фторурацил и 5-бромурацил, 9-аминоакридин, бромистый этидий, от «SigmaChemical Co»

(США). Ципрофлоксацин от «Промед Экспортс Пвт. Лтд» (Индия), налидиксовая кислота от «Хиноин» (Венгрия). Лекарственные препараты из российских фармацевтических компаний: диоксидин ("Мосхимфармпрепараты"), фурацилин («Татхимфармпрепараты»), 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 30-150 Дж/м<sup>2</sup>. Дозу облучения контролировали трехканальным УФ-радиометром ТКА-ПКМ (12).

### 2.5.1 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-1В («Biosan»). Затем суспензию культивировали в течение 2 часов при 37<sup>0</sup>С на 120 об/мин. до ранней логарифмической фазы.

### 2.5.2 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 икубации 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  $t$ .

### 2.5.3 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 PCo1D. 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°C, добавляли 20 мкл индуктора. Люминесценцию измеряли через 90 минут инкубации культуры с индуктором (37°C).

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.

#### **2.5.4 Анализ совместной токсичности D<sub>2</sub>O и индукторов SOS-ответа на клетках биосенсора *E. coli* MG1655 (pRecA::lux)**

##### **и нормирование 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°C с конечным содержанием оксида дейтерия 7,5%. После добавления 20 мкл воды в контрольные ячейки и различных концентраций 4-NHO, 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 100 мкг/мл. Чашки инкубировали при 37°C в течение ночи, на следующий день подсчитывались выросшие колонии. На основании этих данных полуночно нормировали люминесценцию на 10<sup>7</sup> кое/мл.

#### **2.5.5 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°C. 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>. Объём 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).

### **2.5.6 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.

## 2.6 Статистический анализ данных

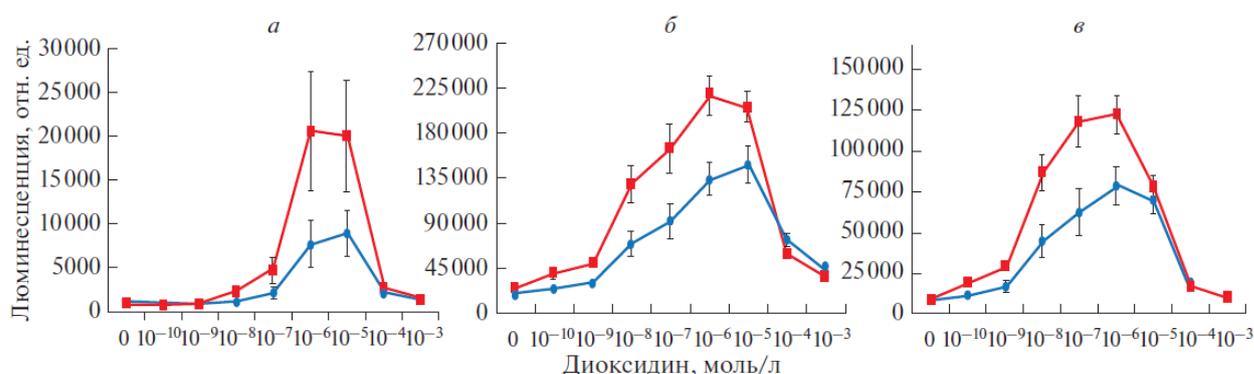
Данные люминесценции использованных биосенсоров при определении их АО на действие индукторов, анализе эффективности режима дейтерирования, исследовании модифицирующего действия D2O и анализе влияния совместной токсичности, а также данные о количестве жизнеспособных клеток штамма *E. coli* MG1655 (pRecA::lux) 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 недейтерированного 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  $C_t$ . Данные  $C_t$ , 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  $C_t$ .

## ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

### 3.1 Определение амплитуды ответа биосенсоров

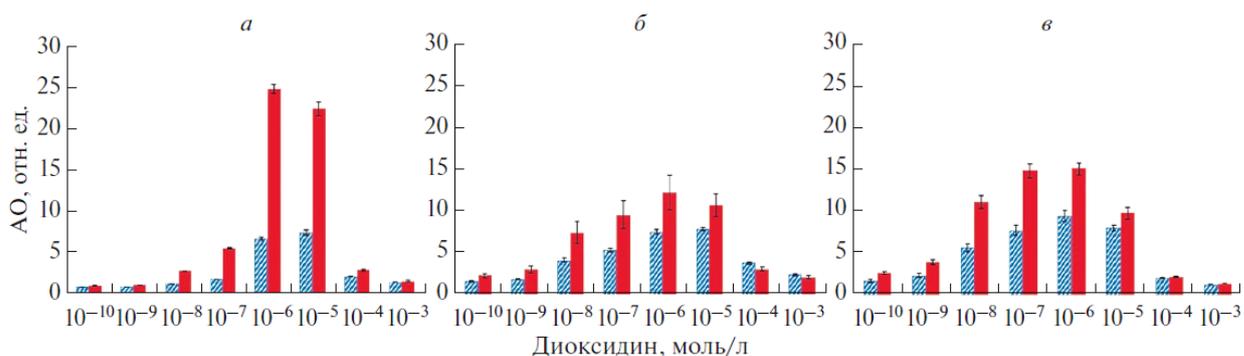
Тестирование индукторов проводили на четырех lux-биосенсорах PRecA, PColD, PDinI и PAlkA в 8 повторностях в трех независимых экспериментах. Регистрировалась зависимость интенсивности люминесценции биосенсоров в относительных единицах RLU от дозы генотоксичных агентов при экспозиции культуры с генотоксикантами в течение 60 и 90 минут. На рис. 6 представлены кривые ответа биосенсоров PColD, PRecA и PDinI при воздействии диоксидина в различных концентрациях.



**Рисунок 6.** Показатели интенсивности люминесценции биосенсоров PColD (а), PRecA (б) и PDinI (в) при действии диоксидина; экспозиция 60 (синяя линия) и 90 (красная линия) минут.

Диоксидин индуцировал люминесценцию в интервале концентраций  $10^{-6}$ – $10^{-4}$  моль/л у биосенсора PColD, диапазон активных концентраций диоксидина на биосенсорах PRecA и PDinI составил от  $10^{-8}$  до  $10^{-4}$  моль/л. Диоксидин в концентрациях более  $10^{-4}$  подавлял свечение бактерий вследствие бактерицидного эффекта.

По данным интенсивности биолюминесценции используемых сенсорных штаммов при воздействии на них генотоксикантов рассчитывались амплитуды ответа (АО), отражающие отношение интенсивности люминесценции в присутствии индуктора к таковой в отрицательном контроле на момент измерения люминесценции. АО выражается в относительных единицах.



**Рисунок 7.** Показатели АО биосенсоров PColD (*а*), PRecA (*б*) и PDinI (*в*) при действии диоксидина; экспозиция 60 (синий) и 90 (красный) минут.

По показателям АО биосенсоров, представленных на рис.7 можно судить о максимально эффективных концентрациях тестируемого агента. В случае диоксидина такими концентрациями являются:  $10^{-6}$  на биосенсоре PColD (АО=25,0),  $10^{-6}$  на биосенсоре PRecA (АО=12,0) и  $10^{-7}$ – $10^{-6}$  на биосенсоре PDinI (АО=15). Количественные показатели АО при максимально эффективных дозах 17 протестированных индукторов для четырех lux-биосенсоров PRecA, PColD, PDinI и PAlkA приведены в таблице 2.

Минимальные концентрации исследуемых генотоксичных агентов, вызывающие статистически значимое повышение индуцированной люминесценции над контролем, приведены в таблице приложения 1. Эти концентрации представляют собой пороговые значения эффективных доз индукторов при воздействии на используемые lux-биосенсоры.

### **3.1.1. Анализ эффективности генотоксикантов для индукции SOS-ответа у штаммов *E.coli* MG1655 (pRecA::lux), *E.coli* MG1655 (pColD::lux) и *E.coli* MG1655 (pDinI::lux)**

Наибольшая амплитуда ответа наблюдалась у биосенсора PColD при воздействии митомицина С (АО=47,1),  $H_2O_2$  (АО=41,3), 4-НХО (АО=40,1), ММС (АО=30,1) и УФ (АО=26,9) при 90 минут экспозиции. Следующим по данному критерию был штамм PDinI, продемонстрировавший АО=29,0 при обработке перекисью водорода и АО=26,0 при воздействии митомицина С, а также данный биосенсор показал наибольшую величину ответа из трех SOS-штаммов на НММ с АО=20,0. Наибольшие значения АО у штамма PRecA

наблюдались при воздействии налидиксовой кислоты (АО=12,4), диоксидина (АО=12,0) и MMC (АО=8,6).

При общей оценке увеличения экспрессии рассматриваемых генов SOS-ответа наибольший эффект на трех штаммах имели вещества, инициирующие свободнорадикальное окисление: диоксидин (PCoID АО=24,9; PRecA АО=12,0; PDinI АО=15,0) и H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (PCoID АО=41,3; PRecA АО=7,5; PDinI АО=29,2); алкилирующие вещества: HMM (PCoID АО=18,6; PRecA АО=7,9; PDinI АО=20,0) и MMC (PCoID АО=30,1; PRecA АО=8,6; PDinI АО=15,0); а также, в меньшей степени, вызывающий аддукты 4-НХО (PCoID АО=40,1; PRecA АО=9,6; PDinI АО=8,3) и ведущий к образованию межнитевых и внутринитевых сшивок митомицин С (PCoID АО=47,1; PRecA АО=7,0; PDinI АО=26,0).

**Таблица 2.** АО биосенсоров PColD, PRecA, PDinI и PAlkA при действии максимально эффективных доз генотоксичных агентов в течение 60 и 90 минут в условных единицах (в скобках отмечены концентрации индукторов).

Индуктор	Диапазон доз, <i>моль/л*</i>	PColD		PRecA		PDinI		PAlkA	
		60'	90'	60'	90'	60'	90'	60'	90'
Митомицин С	$10^{-8}$ – $5 \times 10^{-5}$	22,8 ( $5 \times 10^{-5}$ )	47,1 ( $5 \times 10^{-6}$ )	5,4 ( $5 \times 10^{-5}$ )	7,0 ( $10^{-5}$ )	15,0 ( $5 \times 10^{-6}$ )	26,0 ( $5 \times 10^{-6}$ )	-**	-
Диоксидин	$10^{-13}$ – $4,5 \times 10^{-4}$	7,4 ( $10^{-6}$ )	24,9 ( $10^{-7}$ )	7,6 ( $10^{-6}$ )	12,0 ( $10^{-7}$ )	9,4 ( $10^{-7}$ )	15,0 ( $10^{-7}$ )	-	-
Фурацилин	$10^{-6}$ – $10^{-4}$	1,5 ( $2,5 \times 10^{-5}$ )	4,4 ( $5 \times 10^{-5}$ )	1,9 ( $2,5 \times 10^{-5}$ )	4,0 ( $2,5 \times 10^{-5}$ )	2,2 ( $10^{-5}$ )	4,8 ( $2,5 \times 10^{-5}$ )	-	-
4-НХО	$2 \times 10^{-5}$ – $3,2 \times 10^{-4}$	18,5 ( $3,2 \times 10^{-4}$ )	40,1 ( $3,2 \times 10^{-4}$ )	5,7 ( $1,6 \times 10^{-4}$ )	9,6 ( $1,6 \times 10^{-4}$ )	3,5 ( $8 \times 10^{-5}$ )	8,3 ( $1,6 \times 10^{-4}$ )	-	-
Налидиксовая кислота	$10^{-6}$ – $10^{-2}$	5,3 ( $10^{-2}$ )	12,9 ( $10^{-2}$ )	8,6 ( $5 \times 10^{-3}$ )	12,4 ( $5 \times 10^{-3}$ )	3,7 ( $5 \times 10^{-4}$ )	4,7 ( $5 \times 10^{-4}$ )	-	-
Ципрофлоксацин	$5 \times 10^{-8}$ – $5 \times 10^{-4}$	7,5 ( $10^{-5}$ )	11,5 ( $10^{-5}$ )	5,5 ( $5 \times 10^{-5}$ )	6,5 ( $10^{-6}$ )	5,2 ( $10^{-6}$ )	6,7 ( $10^{-6}$ )	-	-
НММ	$5 \times 10^{-7}$ – $5 \times 10^{-2}$	15,7 ( $10^{-2}$ )	18,6 ( $10^{-2}$ )	6,8 ( $10^{-2}$ )	7,9 ( $10^{-2}$ )	20,0 ( $10^{-2}$ )	19,6 ( $10^{-2}$ )	133,1 ( $10^{-2}$ )	415,5 ( $10^{-2}$ )
ММС	$5 \times 10^{-7}$ – $5 \times 10^{-2}$	26,8 ( $10^{-2}$ )	30,1 ( $10^{-2}$ )	6,8 ( $5 \times 10^{-3}$ )	8,6 ( $5 \times 10^{-3}$ )	11,3 ( $5 \times 10^{-3}$ )	15,0 ( $5 \times 10^{-3}$ )	93,1 ( $5 \times 10^{-3}$ )	181,6 ( $5 \times 10^{-3}$ )
Перекись водорода	$10^{-3}$ – $7,5 \times 10^{-2}$	23,1 ( $2,5 \times 10^{-3}$ )	41,3 ( $2,5 \times 10^{-3}$ )	6,3 ( $7,5 \times 10^{-3}$ )	7,5 ( $7,5 \times 10^{-3}$ )	17,6 ( $2,5 \times 10^{-3}$ )	29,2 ( $5 \times 10^{-3}$ )	-	-
<i>Цис</i> -платина	$5 \times 10^{-7}$ – $10^{-4}$	2,6 ( $10^{-4}$ )	7,4 ( $10^{-4}$ )	3,0 ( $10^{-4}$ )	5,1 ( $10^{-4}$ )	3,0 ( $10^{-4}$ )	8,6 ( $10^{-4}$ )	-	-
Стрептозоцин	$10^{-9}$ – $5 \times 10^{-4}$	3,1 ( $5 \times 10^{-5}$ )	3,1 ( $5 \times 10^{-5}$ )	2,4 ( $5 \times 10^{-5}$ )	2,9 ( $5 \times 10^{-5}$ )	4,6 ( $10^{-6}$ )	7,3 ( $5 \times 10^{-6}$ )	61,0 ( $5 \times 10^{-5}$ )	119,0 ( $5 \times 10^{-5}$ )
9-АА	$10^{-3}$ – $5 \times 10^{-1}$	1,3 ( $10^{-1}$ )	1,9 ( $7,5 \times 10^{-2}$ )	1,5 ( $2,5 \times 10^{-1}$ )	1,3 ( $7,5 \times 10^{-2}$ )	-	1,6 ( $7,5 \times 10^{-2}$ )	-	-

Бромистый этидий	$10^{-7}$ – $10^{-1}$	-	-	-	-	1,3 ( $10^{-4}$ )	-	-	-
2-аминопурин	$10^{-4}$ – $10^{-2}$	1,3 ( $10^{-3}$ )	2,4 ( $2,5 \times 10^{-3}$ )	1,5 ( $10^{-3}$ )	2,9 ( $10^{-3}$ )	-	2,0 ( $10^{-3}$ )	-	-
5-бромурацил	$10^{-4}$ – $10^{-2}$	1,1 ( $7,5 \times 10^{-3}$ )	1,6 ( $10^{-2}$ )	2,6 ( $10^{-2}$ )	4,6 ( $10^{-2}$ )	2,5 ( $10^{-2}$ )	4,6 ( $10^{-2}$ )	-	-
5-фторурацил	$10^{-4}$ – $10^{-2}$	-	1,3 ( $7,5 \times 10^{-4}$ )	-	1,5 ( $10^{-3}$ )	1,8 ( $5 \times 10^{-4}$ )	3,6 ( $7,5 \times 10^{-4}$ )	-	-
УФ	30-150 Дж/м <sup>2</sup>	11,1 (150)	26,9 (150)	3,5 (150)	4,5 (150)	3,2 (150)	3,7 (150)	-	-

\* - для УФ дозы представлены в единицах Дж/м<sup>2</sup>

\*\* - значимое повышение люминесценции относительно спонтанного уровня не наблюдалось

АО биосенсора PColD при действии митомицина С, диоксидина, 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, HMM и MMC наблюдалось при более высоких концентрациях этих соединений, чем на штаммах PRecA и PDinI.

Из данных по АО биосенсоров PColD, PRecA и PDinI (таблица 2) следует, что АО PDinI более выражена, чем АО PRecA, при действии алкилирующих агентов: HMM и MMC; антибактериального препарата диоксидина 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 (PCoID AO=2,4; PRecA AO=2,9; PDinI AO=2,0). 5-Бромурацил проявил бóльшую активность на PRecA (AO=4,6) и PDinI (AO=4,6), чем на штамме PCoID (AO=1,6). 5-Фторурацил индуцировал SOS-ответ у биосенсоров PCoID (AO=1,3) и PRecA (AO=1,5) только при 90 минут инкубации, у биосенсора PDinI AO=3,6 при тех же условиях.

Продукт гена *recA* играет ключевую роль в SOS-ответе *E. coli*. В неиндуцированной клетке его экспрессия достигает примерно 7000 молекул белка RecA, при повреждении ДНК экспрессия увеличивается в 50 раз [Horii *et al.*, 1980; Karu *et al.*, 1982]. Белок RecA имеет рекомбиназную и копротеазную функции, активация которых требует наличия одноцепочечных разрывов ДНК, которые являются триггером, запускающим SOS-ответ [Craig and Roberts, 1981; Shibata *et al.*, 1981]. Ген *dinI* экспрессируется на ранних этапах SOS-ответа, в это время синтезируется некоторое количество UmuD, но его протеолиз до активного состояния UmuD' блокируется белком DinI, что предотвращает запуск мутагенеза в начале SOS-репарации [Janion, 2008]. DinI не обнаруживается во время нормального роста бактерий, его экспрессия индуцируется повреждением ДНК и регулируется белками LexA и RecA [Yasuda *et al.*, 1998; Voloshin *et al.*, 2001]. При сравнении данных по АО lux-биосенсоров PRecA и PDinI, видно, что индуцированная тестируемыми веществами люминесценция штамма PDinI была выше в 10 случаев из 17, при этом фурацилин, цисплатина, 5-бромурацил, 5-фторурацил и стрептозотоцин вызвали наибольший ответ на биосенсоре PDinI из всех трех штаммов.

Экспрессия генов колицинов при индукции SOS-регулона запускается только при серьезном и стойком повреждении ДНК, когда системы репарации не способны справиться с повреждениями [Salles *et al.*, 1987, Herschman and Helinski, 1967]. В целом, из 17 протестированных индукторов

8 эффективнее индуцировали экспрессию колицинового гена *cda*, о чем свидетельствует наибольшие АО биосенсора PColD на следующие генотоксиканты: митомицин С, диоксидин, 4-НХО, ципрофлоксацин, ММС, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 9АА, УФ.

### **3.1.2 Анализ эффективности алкилирующих соединений индуцировать экспрессию *ada*-регулона по люминесценции биосенсора *E.coli* MG1655 (pAlkA:*lux*)**

Результаты изучения индукции экспрессии гена *alkA* алкилирующими агентами метилметансульфонатом (ММС), 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. 8. 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. 8А). Величина ответа коррелировала с временем инкубации, так интенсивность люминесценции при 90 минут экспозиции с ММС превысила в 4 раза люминесценцию штамма PAlkA 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 PAlkA (рис. 8А, 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

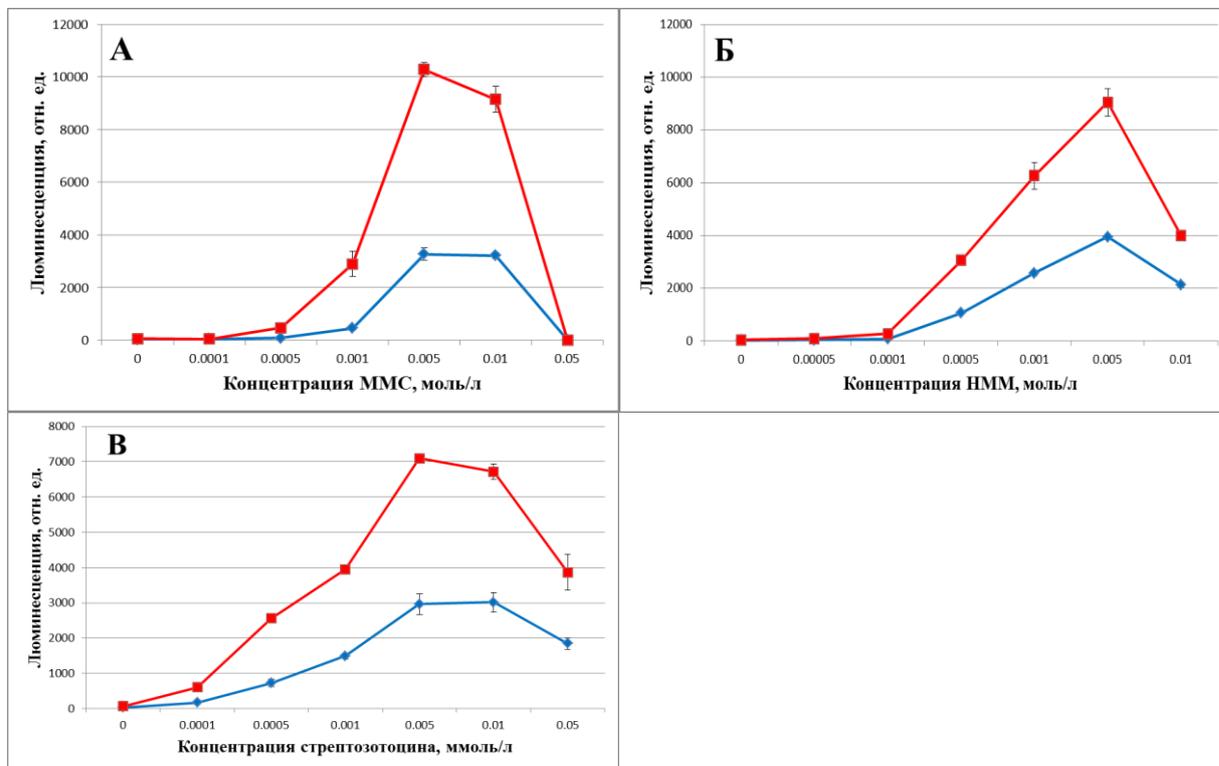
вещества ( $10^{-9}$  моль/л), вызывающим значимый ответ биосенсора PAIkA. Максимальный уровень люминесценции наблюдался при концентрации стрептозотоцина  $5 \times 10^{-5}$  моль/л при 90 минут инкубации клеток биосенсора с генотоксикантом (рис.8В). При концентрациях стрептозотоцина  $\geq 5 \times 10^{-5}$  моль/л наблюдалось снижение люминесценции биосенсора вследствие токсичного эффекта.

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

Алкилирующие соединения реагируют с нуклеофильными (электроотрицательными) участками в молекулах нуклеиновых кислот и белков, формируя ковалентные связи. Различают два типа нуклеофильных замещений: мономолекулярное и бимолекулярное, которые характеризует кинетику реакций с биологическими молекулами. НММ алкилирует ДНК по первому типу нуклеофильного замещения и проявляет высокую мутагенную активность в результате образования  $O_6$ -метилгуанина ( $O_6$ -MeГ), который во время репликации ДНК спаривается с тиминном, что приводит к транзиции G:C – A:T.  $O_6$ -MeГ репарируется  $O_6$ -алкилгуанин-ДНК-алкилтрансферазой, кодируемой геном *ada*. ММС действует по бимолекулярному типу замещения и преимущественно реагирует с однонитевой ДНК, приводя к образованию  $N_1$ -метиладенина и  $N_3$ -метилцитозина. В двухцепочечной ДНК эти две позиции защищены за счет водородных связей, но нуклеофильны в однонитевой ДНК или репликативной вилке.  $N_1$ -метиладенин и  $N_3$ -метилцитозин в однонитевой ДНК блокируют репликацию ДНК и приводят к токсическим последствиям. Метилированные аденин и цитозин удаляются из ДНК путем окисления Fe(II)-зависимой диоксигеназой, этот механизм обеспечивается геном *alkB* *ada*-регулона [Mielecki and Grzesiuk, 2014].

Противоопухолевое средство стрептозотонин, производное нитрозомочевины, выделенно из *Streptomyces achromogenes*. Стрептозотонин

является мощным ДНК-алкилирующим агентом, вызывает образование межнитевых сшивок, что приводит к ингибированию синтеза ДНК [Bolzan and Bianchi, 2002]. В рамках данного исследования соединение значительно повышало экспрессию *ada*-регулона, начиная с концентрации  $10^{-9}$  моль/л.



**Рисунок 8.** Показатели интенсивности люминесценции биосенсора PA1kA при воздействии ММС (А), НММ (Б) и стрептозотоцина (В); экспозиция 60 (синяя линия) и 90 (красная линия) минут.

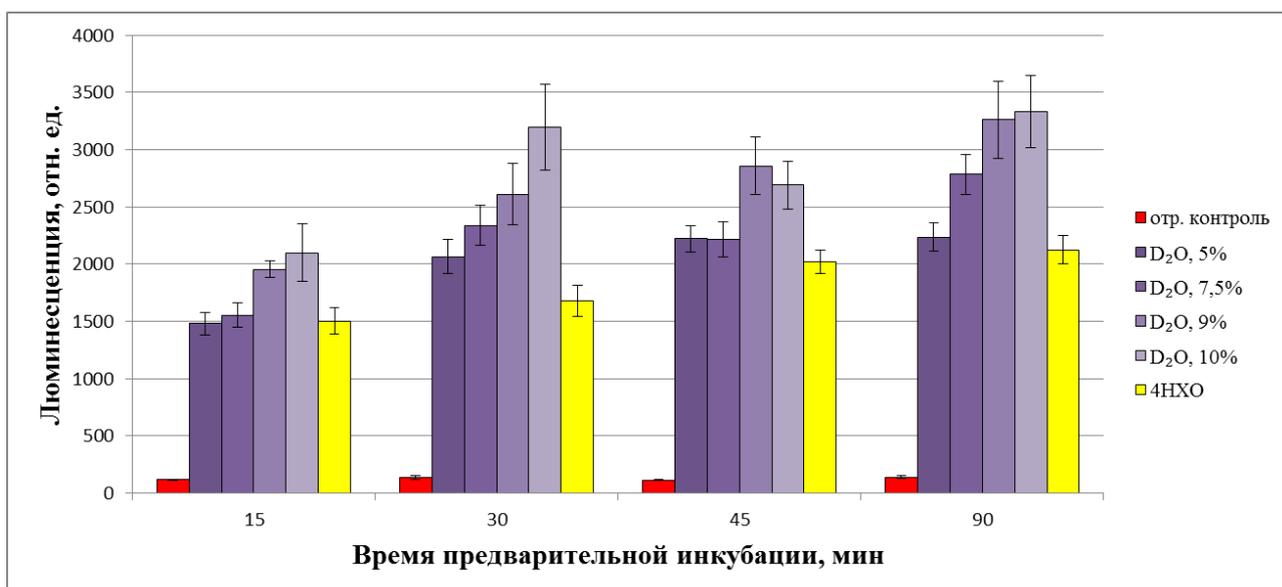
Восстановление повреждений ДНК, вызванных ММС, НММ и стрептозотоцином зависело от концентрации самих алкилирующих соединений и продолжительности инкубации. Для дальнейшего исследования их влияния на индукцию экспрессии гена *alkA* использовали ММС и НММ в концентрации  $5 \times 10^{-4}$  моль/л и стрептозотоцин в концентрации  $10^{-5}$  моль/л, что соответствует наиболее эффективным концентрациям при 90 минут экспозиции со штаммом PA1kA (рис. 8).

### 3.2 Определение эффективного режима дейтерирования

На данном этапе исследования изучалось влияние продолжительности предварительного дейтерирования бактерий на модифицирующий эффект  $D_2O$ . Для этого использовался биосенсор PColD, регистрирующий SOS-ответ, и мутаген 4-НХО в подобранной ранее эффективной концентрации  $8 \times 10^{-4}$  моль/л.  $D_2O$  в концентрациях 9 и 10% усиливал SOS-ответ, индуцированный 4-НХО, начиная с 15 минут предварительного дейтерирования клеток биосенсора (рис. 9). Люминесценция предейтерированной культуры в концентрациях 7,5; 9 и 10% значительно превышала уровень люминесценции недедейтерированной культуры при 90 минут инкубации.

В инкубационной среде на высокой скорости происходит изотопный обмен дейтерия с протием:  $H_2O + D_2O \leftrightarrow 2HDO$ , благодаря которому, в растворах атомы дейтерия присутствуют в составе молекул HDO. При этом изотопный эффект дейтерия, возникающий в результате способности  $D_2O$  замещать H на D в молекулах и приводящий к получению дейтерированных организмов вследствие их роста в среде с содержанием дейтерия, обуславливает эффекты дейтерия в биологических системах. Связь C–D примерно в 10 раз прочнее, чем C–H, более устойчива к химическому или ферментативному расщеплению и имеет тенденцию оставаться стабильной в  $H_2O$  длительное время. O–D, N–D и S–D связи так же прочнее, чем соответствующие протиевые, но D в таких связях быстро обменивается с H в  $H_2O$  [Thomas, 1971].

В рамках данного исследования, на основании результатов тестирования (рис. 9), в качестве эффективного режима предейтерирования была выбрана экспозиция клеток биосенсоров PRecA, PColD, PDinI и PAlkA в течение 90 минут в среде с содержанием оксида дейтерия 5; 7,5; 9 и 10%.

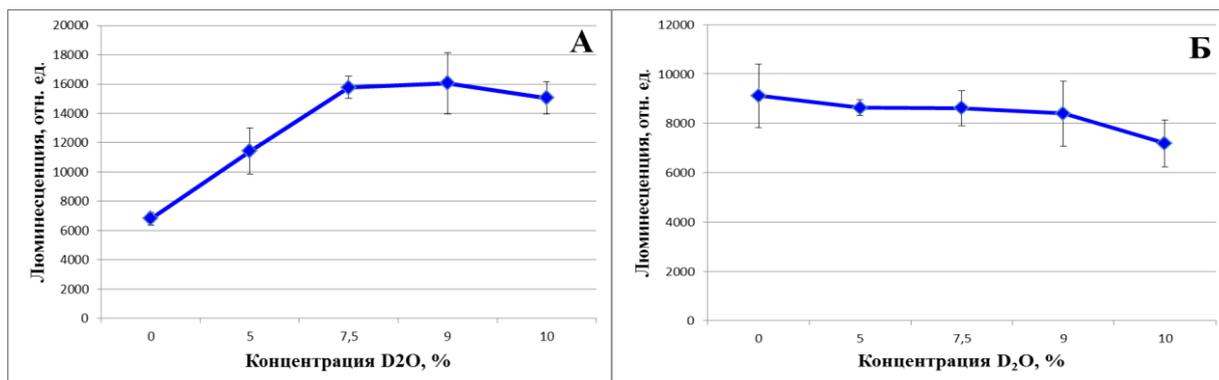


**Рисунок 9.** Влияние концентрации D<sub>2</sub>O в инкубационном растворе и продолжительности предварительного дейтерирования биосенсора PColD на SOS-ответ, индуцированный 4-NHO в концентрации  $8 \times 10^{-5}$  моль/л.

### 3.3 Исследование модифицирующего действия дейтерия на индуцибельные процессы в клетках *E.coli*

Изучение изотопного эффекта дейтерия проводили на четырех lux-биосенсорах PResA, PColD, PDinI и PAlkA в 8 повторностях в трех независимых экспериментах. В качестве отрицательного контроля использовалась вода или соответствующий растворитель. В качестве индукторов SOS-ответа и *ada*-регулона применялись генотоксиканты в подобранных ранее эффективных концентрациях (гл. 3.1). Культуры биосенсоров инкубировались в среде с содержанием D<sub>2</sub>O (5;7,5;9 и 10%) в двух режимах. В одном случае клетки предварительно дейтерировались до добавления в среду индуктора в течение 90 минут, в другом – экспозиция проходила с одновременным наличием в среде D<sub>2</sub>O и генотоксиканта. Регистрировалась зависимость интенсивности индуцированной генотоксичными агентами люминесценции биосенсоров в относительных единицах RLU от концентрации оксида дейтерия. На рис. 10 представлены данные люминесценции биосенсора PColD при индукции SOS-ответа ингибитором ДНК-гиразы, налидиксовой кислотой, в концентрации  $10^{-3}$

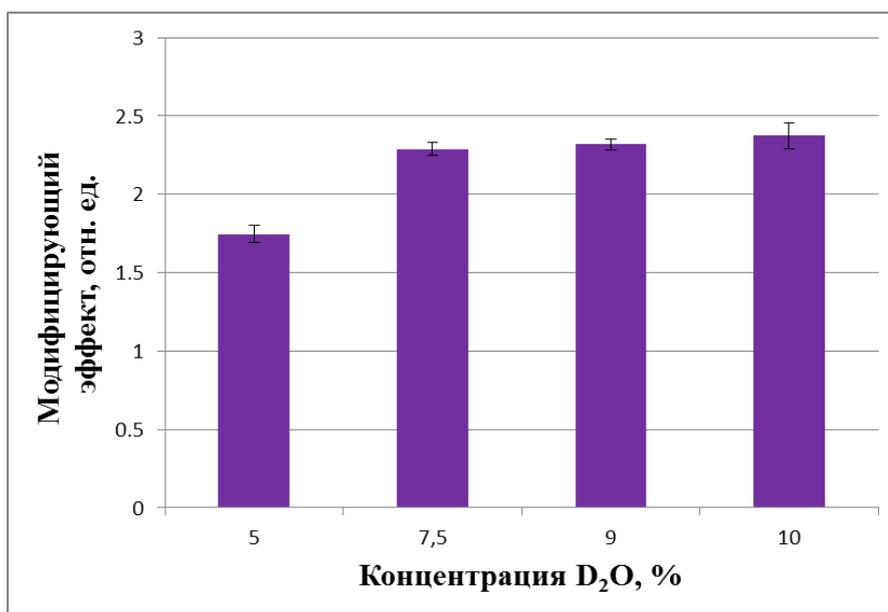
моль/л при предварительном дейтерировании культуры и при совместной инкубации клеток биосенсора с D<sub>2</sub>O и налидиксовой кислотой.



**Рисунок 10.** Влияние D<sub>2</sub>O на индуцированный налидиксовой кислотой SOS-ответ в предейтерированной культуре (А) и при экспозиции культуры с D<sub>2</sub>O и налидиксовой кислотой совместно.

Наблюдалось повышение уровня SOS-ответа у предварительно дейтерированной культуры биосенсора PColD, в случае инкубации с одновременным содержанием налидиксовой кислоты и D<sub>2</sub>O значимых отличий в люминесценции не выявлено.

По данным люминесценции биосенсоров в относительных единицах RLU рассчитывалась величина модифицирующего действия дейтерия. Она определялась в качестве отношения люминесценции дейтерированной культуры к недейтерированной. Для налидиксовой кислоты D<sub>2</sub>O в концентрациях 7,5; 9 и 10% увеличивал уровень индукции SOS-ответа более чем в 2 раза на штамме PColD (рис.11). Значения величины модифицирующего эффекта оксида дейтерия на действие генотоксикантов на трех штаммах биосенсоров PRecA, PColD и PDinI для предейтерирования представлены в таблице приложения 2, для совместной инкубации в таблице приложения 3.



**Рисунок 11.** Зависимость величины модифицирующего действия D<sub>2</sub>O от концентрации при индукции SOS-ответа налидиксовой кислотой 10<sup>-3</sup> моль/л на биосенсоре PColD.

### 3.3.1 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*)

Действие индукторов SOS-ответа исследовалось в выбранных при анализе АО эффективных дозах на дейтерированной в течение 90 минут культуре штаммов *E.coli* MG1655 (pRecA::*lux*), *E.coli* MG1655 (pColD::*lux*) и *E.coli* MG1655 (pDinI::*lux*). Были использованы 2 режима дейтерирования клеток биосенсоров: предейтерирование – предварительное дейтерирование культуры с последующим добавлением генотоксиканта в среду инкубации, и совместное дейтерирование – инкубация клеток в среде с совместным содержанием D<sub>2</sub>O и индуктора. 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.

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

### 3.3.1.1 Алкилирующие соединения

Модифицирующий эффект D<sub>2</sub>O на действие алкилирующих соединений исследовался с использованием 3 агентов: НММ (10<sup>-3</sup> моль/л), ММС (5×10<sup>-4</sup> моль/л) и стрептозотоцина (10<sup>-5</sup> моль/л).

При предварительном дейтерировании клеток биосенсоров в среде с содержанием D<sub>2</sub>O в концентрации 5, 7,5, 9, 10% в течение 90 минут наблюдали повышение уровня индуцированной алкилирующими агентами люминесценции дейтерированных клеток используемых штаммов (таблица 3). Наибольший потенцирующий эффект D<sub>2</sub>O обнаружен при индукции SOS-ответа НММ у штаммов PColD (D=1,54 при содержании 7,5% D<sub>2</sub>O в среде инкубации) и PRecA (D=1,52 при 9% D<sub>2</sub>O), значения показателя модифицирующего действия D при этом наблюдались в диапазонах 1,36-1,54 и 1,29-1,52, соответственно. В случае применения ММС изменения показателя D наблюдались при 1,14-1,24 для штамма PRecA и 1,08-1,47 для PDinI, значение показателя D для штамма PColD превысило уровень значимости при содержании 10% D<sub>2</sub>O в среде предварительной инкубации (D=1,18). Значимое повышение уровня индуцированной стрептозотоцином люминесценции предейтерированных клеток зафиксировано для 3 используемых биосенсоров (1,11-1,51) с максимальным потенцирующим эффектом при 10% D<sub>2</sub>O в среде инкубации PColD (D=1,51).

При дейтерировании клеток штаммов PRecA, PDinI и PColD в среде с совместным содержанием D<sub>2</sub>O и стрептозотоцина не наблюдалось значимого повышения уровня люминесценции дейтерированной культуры относительно недедейтерированного контроля (таблица 4). Штамм PColD не демонстрировал

значимого увеличения люминесценции дейтерированных клеток также в случаях применения НММ и ММС. Потенцирующий эффект дейтерирования наблюдался при инкубации бактерий PRecA в среде с совместным содержанием D<sub>2</sub>O и одного из алкиляторов, НММ или ММС, диапазоны значений D составили 1,14-1,16 (5-9% D<sub>2</sub>O) и 1,13-1,19 (7,5-10% D<sub>2</sub>O), соответственно. Однако показатель модифицирующего действия дейтерия в данном случае не достигал максимальных значений, полученных при предварительном дейтерировании клеток данного штамма. Увеличение уровня люминесценции биосенсора PDinI при наличии в среде инкубации D<sub>2</sub>O и НММ (1,07-1,09) или ММС (1,08 при 9% D<sub>2</sub>O) было значимым, но ниже значений D, достигнутых в случае предейтерирования.

Таблица 3. Значения показателя модифицирующего действия дейтерия на ДНК-повреждающую активность алкилирующих соединений при предварительном дейтерировании биосенсоров PColD, PRecA и PDinI в течение 90 минут (серым выделены значения, не превысившие уровень значимости p<0,05).

PCoID				PRecA				PDinI			
D <sub>2</sub> O <sub>5%</sub>	7,5%	9%	10%	5%	7,5%	9%	10%	5%	7,5%	9%	10%
НММ, 10 <sup>-3</sup> моль/л											
1,50	1,54	1,47	1,36	1,39	1,46	1,52	1,29	0,95	1,10	1,16	1,03
ММС, 5x10 <sup>-4</sup> моль/л											
1,09	0,99	0,95	1,18	1,21	1,24	1,14	1,00	1,08	1,24	1,47	1,38
Стрептозоцин, 10 <sup>-5</sup> моль/л											
1,16	1,24	1,35	1,51	1,11	1,13	1,16	1,14	1,15	1,18	1,14	1,12

Алкилирующие агенты взаимодействуют с нуклеофильными центрами ДНК, перенося алкильную группу на атомы азота и кислорода в пуриновых и пиримидиновых основания, а также фосфатной группе ДНК, образуя широкий спектр аддуктов ДНК: N7, N3-алкилпурины, Об-алкилгуанин и О4-алкилтимин [Lijinsky, 1976; Magee *et al.*, 1976; Margison and O'Connor, 1979; Singer and Kusmierck, 1982; Deshpande, 2002]. Более 70% метилирования ДНК

при этом происходит в положении N7 гуанина [Bennett and Pegg, 1981; Day *et al.*, 1987; Pegg *et al.*, 1995; Carucci *et al.*, 1995].

Повреждения ДНК, вызванные алкилирующими агентами, зависят как от количества реакционноспособных центров у соединения, так и от типа их химической реактивности [Fu *et al.*, 2012]. По наличию химически активных групп алкилирующие соединения делятся на монофункциональные (ММС, НММ, стрептозотоцин), содержащие одну группу и, следовательно, способные к модификации единственного сайта в ДНК, и бифункциональные (митомицин С), имеющие две функциональные группы, ковалентно связывающиеся с двумя основаниями ДНК и приводящие к образованию меж- и внутринитевых сшивок ДНК [Cole, 1973; Dronkert and Kanaar, 2001; Sinha and Hader, 2002].

Таблица 4. Значения показателя модифицирующего действия дейтерия на ДНК-повреждающую активность алкилирующих соединений при инкубации биосенсоров PColD, PRecA и PDinI в среде с совместным содержанием дейтерия и индуктора (серым выделены значения, не превысившие уровень значимости  $p < 0,05$ ).

PColD				PRecA				PDinI			
D <sub>2</sub> O <sub>5%</sub>	7,5%	9%	10%	5%	7,5%	9%	10%	5%	7,5%	9%	10%
НММ, 10 <sup>-3</sup> моль/л											
0,84	0,88	0,88	0,83	1,14	1,15	1,16	1,05	1,07	1,09	1,07	1,08
ММС, 5x10 <sup>-4</sup> моль/л											
0,97	0,90	0,85	0,82	1,07	1,13	1,15	1,19	1,04	1,04	1,08	1,04
Стрептозотоцин, 10 <sup>-5</sup> моль/л											
0,87	0,89	0,97	1,05	1,02	0,98	0,99	0,87	0,92	0,93	0,90	0,78

Среди монофункциональных алкилирующих агентов по типу реакции нуклеофильного замещения выделяют SN1 агенты (унимолекулярное) и SN2 агенты (бимолекулярное). SN1 участвуют в реакциях первого порядка, на кинетику которых влияет концентрация алкилирующего соединения и скорость образования интермедиата, SN2 - в реакциях второго порядка, со

скоростью, определяемой концентрациями электрофильного агента и нуклеофильного субстрата [Lawley *et al.*, 1973; Goldmacher *et al.*, 1986].

Повреждения, индуцированные алкилирующими соединениями, могут быть восстановлены действием алкилтрансфераз или с помощью эксцизионной репарации оснований (BER). Однако повреждения, которые не удаляются, могут привести либо к одиночным разрывам в ДНК или могут быть преобразованы в двухцепочечные разрывы (DSB) во время процесса репликации [Shrivastav and Essigmann, 2010].

SN1 и SN2 агенты демонстрируют разную способность взаимодействия с экзоциклическим кислородом Об с образованием аддукта Об-метилгуанина, что приводит к повышенному образованию данного типа аддукта в реакциях SN1 (7,0% от общего количества аддуктов) по сравнению с реакциями SN2 (0,3%) [Beranek, 1990].

Несмотря на то, что Об-алкилгуанин является минорным продуктом алкилирования, он вносит наибольший вклад в мутагенное и канцерогенное действие алкилирующих агентов [Beranek, 1990]. Цитотоксичность алкилирующих агентов SN1 типа, таких как НММ и стрептозотоцин, объясняется сохранением Об-метилгуанина в геномной ДНК, что индуцирует транзиции за счет ошибочного спаривания модифицированного гуанина с тиминном в процессе репликации ДНК [Loveless, 1969; Loechler *et al.*, 1984; Goldmacher *et al.*, 1986; Stojic *et al.*, 2004].

В настоящей работе обнаружена разница в ответе люминесцентного биосенсора PCoID на действие SN1 (НММ и стрептозотоцина) и SN2 агентов (ММС) при предварительном дейтерировании клеток штамма. Применение НММ и стрептозотоцина повышало уровень люминесценции сенсора PCoID, свидетельствующей об экспрессии гена колицина. Так как гены колицинов *E. coli* индуцируются при серьезном и стойком повреждении ДНК, и клетка-продуцент вскоре гибнет, наблюдаемый эффект может объясняться

накоплением цитотоксичных аддуктов Об-метилгуанина в условиях замедления реакций репарации, вызванных дейтерированием белков клетки. В тоже время ММС, образующий в 10 раз меньше аддуктов данного типа и метилирующий ДНК, преимущественно с образованием N7-метилгуанина, приводил к наибольшему повышению уровня люминесценции дейтерированного штамма PDinI по сравнению с недейтерированным контролем. Продукт гена *dinI*, являющийся регулятором SOS-ответа, на ранних его этапах блокирует протеолиз UmuD и, таким образом, задерживает обход повреждения ДНК в вилке репликации посредством ДНК-полимеразы V.

### 3.3.1.2 Соединения, образующие межнитевые и внутринитевые сшивки ДНК

Для исследования влияния D<sub>2</sub>O на SOS-ответ биосенсоров *E. coli* PRecA, PDinI и PColD, индуцированный соединениями, вызывающими образование межнитевых и внутринитевых сшивок в ДНК применялись митомицин С ( $5 \times 10^{-8}$  моль/л) и *цис*-платина ( $5 \times 10^{-5}$  моль/л).

При предварительном дейтерировании клеток биосенсоров в среде с содержанием D<sub>2</sub>O в концентрации 5, 7,5, 9, 10% в течение 90 минут наблюдали повышение уровня индуцированной люминесценции дейтерированных клеток 3 используемых штаммов (таблица 5). Увеличение люминесценции дейтерированных культур относительно недейтерированного контроля зафиксировано и для митомицина С и для *цис*-платины. 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%.

Таблица 5. Значения показателя модифицирующего действия дейтерия на ДНК-повреждающую активность препаратов, вызывающих образование сшивок в ДНК (митомицина С и цис-платины), при предварительном дейтерировании биосенсоров PColD, PRecA и PDinI в течение 90 минут (серым выделены значения, не превысившие уровень значимости  $p < 0,05$ ).

PColD				PRecA				PDinI			
D <sub>2</sub> O <sub>5%</sub>	7,5%	9%	10%	5%	7,5%	9%	10%	5%	7,5%	9%	10%
Митомицин С, $5 \times 10^{-8}$ моль/л											
1,61	1,70	1,75	1,52	1,29	1,30	1,34	1,25	1,67	1,65	1,61	1,60
Цис-платина, $5 \times 10^{-5}$ моль/л											
1,31	1,36	1,44	1,27	1,16	1,16	1,16	1,09	1,06	1,11	1,22	1,30

Инкубация клеток биосенсоров в среде с совместным присутствием цис-платины и D<sub>2</sub>O не приводила к значимому повышению уровня люминесценции (таблица 6). Дейтерирование значимо снижало люминесценцию штамма PColD при содержании 10% D<sub>2</sub>O в среде ( $D=0,83$ ) и PRecA при концентрации D<sub>2</sub>O 5-9% (значения  $D$ , соответственно, 0,78-0,87). Экспозиция клеток биосенсора PDinI в среде с совместным присутствием D<sub>2</sub>O и митомицина С приводила к значимому повышению уровня люминесценции дейтерированной культуры относительно недейтерированного контроля с диапазоном значений  $D$  1,11-1,24. Однако наблюдаемое повышение было ниже, чем в случае предварительного дейтерирования клеток данного штамма (1,60-1,67).

Цитотоксический противораковый препарат митомицин С является бифункциональным алкилирующим ДНК агентом, индуцирует перекрестное связывание комплементарных цепей ДНК. Обработка клеток митомицином С индуцировала как внутрицепочечные, так и межцепочечные сшивающие аддукты и четыре моноаддукта. При этом межцепочечные сшивки ДНК

являются критическими цитотоксическими повреждениями, вызываемыми митомицином С [Palom *et al.*, 2002].

Таблица 6. Значения показателя модифицирующего действия дейтерия на ДНК-повреждающую активность митомицина С и *цис*-платины при инкубации биосенсоров PColD, PRecA и PDinI в среде с совместным содержанием дейтерия и индуктора (серым выделены значения, не превысившие уровень значимости  $p < 0,05$ ).

PColD				PRecA				PDinI			
D <sub>2</sub> O <sub>5%</sub>	7,5%	9%	10%	5%	7,5%	9%	10%	5%	7,5%	9%	10%
Митомицин С, $5 \times 10^{-8}$ моль/л											
0,62	0,60	0,59	0,55	0,98	0,95	1,00	1,00	1,11	1,17	1,24	1,21
<i>Цис</i> -платина, $5 \times 10^{-5}$ моль/л											
0,76	0,81	0,86	0,83	0,78	0,81	0,87	0,97	0,97	0,96	1,01	1,01

Цисплатин (1,1,2,2-цис-диамминдихлорплатина) — химиотерапевтическое средство, широко используемое в клинике для лечения различных онкологических заболеваний. Противоопухолевую активность цисплатина объясняет его способность образовывать внутрицепочечные и межцепочечные поперечные связи ДНК-ДНК посредством последовательного платинирования двух нуклеофильных сайтов в дуплексе ДНК. Цисплатин также индуцирует ДНК-белковые повреждения, которые могут способствовать блокированию репликации и транскрипции ДНК [Ming *et al.*, 2020].

Таким образом, ДНК-повреждающие эффекты этих препаратов обусловлены образованием бифункциональных аддуктов в ДНК, но при этом цисплатин вызывает преимущественно внутрицепочечные поперечные сшивки, а митомицин С – межцепочечные [Keller *et al.*, 2001]. В рамках данного исследования именно митомицин С вызывал более высокий уровень люминесценции биосенсорных штаммов при их предварительном дейтерировании по сравнению с цисплатином.

### 3.3.1.3 Аналоги оснований нуклеиновых кислот

Для изучения способности оксида дейтерия модифицировать действие аналогов оснований нуклеиновых кислот были использованы 2-аминопурин ( $2,5 \times 10^{-3}$  моль/л), 5-бромурацил ( $10^{-2}$  моль/л) и 5-фторурацил ( $5 \times 10^{-4}$  моль/л).

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 (таблица 7).

Таблица 7. Значения показателя модифицирующего действия дейтерия на ДНК-повреждающую активность аналогов оснований нуклеиновых кислот при предварительном дейтерировании биосенсоров PColD, PRecA и PDinI в течение 90 минут (серым выделены значения, не превысившие уровень значимости  $p < 0,05$ ).

PColD				PRecA				PDinI			
D <sub>2</sub> O <sub>5%</sub>	7,5%	9%	10%	5%	7,5%	9%	10%	5%	7,5%	9%	10%
2-аминопурин, $2,5 \times 10^{-3}$ моль/л											
1,02	1,49	1,46	1,51	1,16	1,34	1,63	1,22	1,27	1,64	2,22	2,14
5-бромурацил, $10^{-2}$ моль/л											
0,90	0,96	1,10	1,23	0,87	0,82	0,77	0,75	0,98	1,01	0,82	0,81
5-фторурацил, $5 \times 10^{-4}$ моль/л											
0,91	0,91	0,92	1,09	0,76	0,88	0,78	0,89	0,95	0,97	0,97	0,91

При использовании 5-бромурацила в качестве индуктора SOS-ответа повышалась люминесценция предейтерированных клеток биосенсора PColD при концентрации 9 и 10% D<sub>2</sub>O в среде культивирования, значения D=1,10 и 1,23, соответственно. В случае штаммов PRecA и PDinI обнаружено значимое снижение уровня люминесценции предварительно дейтерированных клеток относительно недейтерированного контроля, как для аналога нуклеиновых

кислот 5-бромурацила, так и 5-фторурацила. Модифицирующий эффект при индукции люминесценции PRecA 5-бромурацилом составил 0,75-0,82, DinI – 0,81-0,82; при индукции 5-фторурацилом биосенсора PRecA диапазон значений показателя модифицирующего действия дейтерия D составил 0,76-0,89, для PDinI D=0,91 при 10% D<sub>2</sub>O (таблица 8).

При инкубации используемых биосенсоров в среде с совместным содержанием D<sub>2</sub>O и одного из аналогов оснований нуклеиновых кислот потенцирующий эффект дейтерирования обнаружен только для 2-аминопурина на штамме PRecA при 5 (D=1,18) и 7,5% (D=1,28) D<sub>2</sub>O. В остальных случаях дейтерирование снижало люминесценцию биосенсорных штаммов. Значения D для штамма PColD были в диапазоне 0,47-0,72, для PDinI D=0,92 при 7,5% D<sub>2</sub>O и D=0,64 при 10% D<sub>2</sub>O. В присутствии 5-бромурацила и 10% D<sub>2</sub>O D=0,75 для штамма PColD; при 5-7,5% D<sub>2</sub>O D=0,90 и 0,92, соответственно, для штамма PDinI. Наличие 5 и 9% D<sub>2</sub>O в среде значимо снижало люминесценцию индуцированную 5-фторурацилом, значения модифицирующего действия дейтерия при этом составили D=0,80 и D=0,81, соответственно. Для PDinI снижение наблюдалось при 9 (D=0,96) и 10% (D=0,90) D<sub>2</sub>O (таблица 8).

Таблица 8. Значения показателя модифицирующего действия дейтерия на ДНК-повреждающую активность аналогов оснований нуклеиновых кислот при инкубации биосенсоров PColD, PRecA и PDinI в среде с совместным содержанием дейтерия и индуктора (серым выделены значения, не превысившие уровень значимости p<0,05).

PCoID				PRecA				PDinI			
D <sub>2</sub> O <sub>5%</sub>	7,5%	9%	10%	5%	7,5%	9%	10%	5%	7,5%	9%	10%
2-аминопурин, 2,5x10 <sup>-3</sup> моль/л											
0,72	0,65	0,50	0,47	1,18	1,28	1,01	0,90	0,99	0,92	0,94	0,64
5-бромурацил, 10 <sup>-2</sup> моль/л											
0,90	0,81	0,82	0,75	0,98	0,71	0,75	0,91	0,90	0,92	0,95	1,03
5-фторурацил, 5x10 <sup>-4</sup> моль/л											
0,89	0,88	0,89	1,10	0,80	0,92	0,81	1,01	0,97	0,98	0,96	0,90

2-Аминопурин представляет собой аналог основания аденина, который неправильно спаривается с цитозином и вызывает замены пар оснований, усиливая трансверсии и мутации сдвига рамки считывания. 2-Аминопурин вызывает как А:Т, приводящие к G:C, так и G:C, приводящие к переходам А:Т, при этом первый вариант трансверсий индуцируется чаще, чем второй. [Persing *et al.*, 1981].

5-Бромурацил представляет собой аналог тимина, который включается в ДНК, неправильно спариваясь с гуанином. 5-Бромурацил также, в свою очередь, индуцирует трансверсии А:Т в G:C [Hu *et al.*, 2004].

Антиметаболит 5-фторурацил используется в клинической практике для лечения солидных опухолей, включая колоректальный рак и рак молочной железы. Внутриклеточные метаболиты этого препарата могут оказывать цитотоксическое действие посредством ингибирования тимидилатсинтетазы или путем включения в РНК и ДНК, что в конечном итоге активирует апоптоз [Wyatt and Wilson, 2009]. Один из механизмов действия 5-фторурацила заключается в опосредованном ДНК-полимеразой включении 5-F-dUTP в геномную ДНК, что приводит к образованию пар оснований 5-FU/A или 5-FU/G [Parker and Stivers, 2011].

Из протестированных аналогов оснований 2-аминопурин показал наибольшую эффективность, т.к. повышал уровень люминесценции дейтерированных клеток биосенсоров относительно недейтерированного контроля. Максимальный эффект при этом зафиксирован на штамме *E.coli* MG1655 (pDinI::lux), люминесценция которого свидетельствует об экспрессии гена *dinI*, продукт которого блокирует сборку ДНК-полимеразы V, предотвращая запуск мутагенеза в начале SOS-репарации.

#### **3.3.1.4 Вещества, вызывающие образование аддуктов с ДНК**

Способность оксида дейтерия модифицировать действие генотоксикантов, вызывающих образование аддуктов в ДНК, изучалась с

применением в качестве индукторов экспрессии генов SOS-ответа (*recA*, *cda* (*colD*), *dinI*) 2 соединений: фурацилина ( $2,5 \times 10^{-3}$  моль/л) и 4-НХО ( $8 \times 10^{-5}$  моль/л).

При предварительном дейтерировании клеток биосенсоров в среде с содержанием  $D_2O$  в течение 90 минут наблюдалось повышение уровня индуцированной генотоксикантами люминесценции дейтерированных клеток используемых штаммов (таблица 9). Наибольший потенцирующий эффект  $D_2O$  обнаружен при индукции SOS-ответа фурацилином у штаммов PColD ( $D=4,03$ ) и PRecA ( $D=2,53$ ) при содержании 7,5%  $D_2O$  в среде инкубации, значения показателя модифицирующего действия  $D$  при этом наблюдались в диапазонах 1,95-4,03 и 0,89-2,53, соответственно. В случае индукции фурацилином люминесценции штамма PDinI диапазон значений  $D$  составил 1,61-1,95 с максимальным эффектом дейтерирования при содержании 9%  $D_2O$  в среде инкубации. Уровень люминесценции 3 биосенсоров при использовании аддуктообразователя 4-НХО увеличивался на всем интервале используемых концентраций  $D_2O$  в условиях предейтерирования. Наибольший потенцирующий эффект  $D_2O$  зафиксирован на штамме PColD (10%  $D_2O$ ) при значениях показателя  $D$  1,86-2,08. Увеличение уровня люминесценции предейтерированной культуры штаммов PRecA и PDinI относительно недедейтерированного контроля наблюдалось в диапазонах значений показателя  $D$  1,49-1,82 и 1,44-1,83, соответственно, с максимумом при 9%  $D_2O$ .

Инкубация клеток биосенсоров в среде с совместным присутствием 4-НХО и  $D_2O$  не приводила к значимому повышению уровня люминесценции (таблица 10). В данном случае люминесценция дейтерированных клеток биосенсора PRecA снижалась на всем диапазоне используемых концентраций  $D_2O$  (значения  $D$  0,61-0,77), для PColD снижение зафиксировано при 5,9 и 10 %  $D_2O$  ( $D=0,81$ ; 0,80; 0,49, соответственно), при 9 и 10%  $D_2O$  значения  $D$  составили 0,76 и 0,84 для штамма PDinI. При использовании фурацилина

повышение уровня люминесценции дейтерированной культуры наблюдалось в присутствии 5-9% D<sub>2</sub>O для штамма PRecA (значения D 1,08-1,34), 5, 7,5 и 10% для PDinI (D 1,15-1,30).

Таблица 9. Значения показателя модифицирующего действия дейтерия на ДНК-повреждающую активность аддуктообразователей при предварительном дейтерировании биосенсоров PColD, PRecA и PDinI в течение 90 минут (серым выделены значения, не превысившие уровень значимости  $p < 0,05$ ).

PCoID				PRecA				PDinI			
D <sub>2</sub> O <sub>5%</sub>	7,5%	9%	10%	5%	7,5%	9%	10%	5%	7,5%	9%	10%
Фурацилин, $2,5 \times 10^{-3}$ моль/л											
1,95	4,03	2,78	2,69	2,23	2,53	1,40	0,89	1,61	1,62	1,95	1,91
4-НХО, $8 \times 10^{-5}$ моль/л											
1,86	1,97	1,98	2,08	1,49	1,63	1,82	1,69	1,44	1,64	1,83	1,70

Таблица 10. Значения показателя модифицирующего действия дейтерия на ДНК-повреждающую активность аддуктообразователей при инкубации биосенсоров PColD, PRecA и PDinI в среде с совместным содержанием дейтерия и индуктора (серым выделены значения, не превысившие уровень значимости  $p < 0,05$ ).

PCoID				PRecA				PDinI			
D <sub>2</sub> O <sub>5%</sub>	7,5%	9%	10%	5%	7,5%	9%	10%	5%	7,5%	9%	10%
Фурацилин, $2,5 \times 10^{-6}$ моль/л											
0,95	1,15	1,07	0,97	1,16	1,34	1,08	0,93	1,29	1,15	1,02	1,30
4-НХО, $8 \times 10^{-5}$ моль/л											
0,81	0,93	0,80	0,49	0,75	0,77	0,61	0,62	1,11	0,94	0,76	0,84

В работе использованы известные своим широким применением вещества, вызывающие образование ДНК-аддуктов: 4-НХО является стандартным мутагеном, используемым, благодаря его доказанным канцерогенным и мутагенным свойствам, в качестве позитивного контроля в ряде генотоксических тестов; фурацилин – лекарственное противомикробное средство местного действия.

Химически 4-НХО состоит из двух полярных групп: N-оксида и нитрогруппы, восстановление последней из них нитроредуктазами клетки до 4-гидроксиламинхинолин-1-оксида (4-ГАХО), лежит в основе генотоксического эффекта препарата. Электрофильные молекулы 4-ГАХО реагируют с пуриновыми основаниями ДНК, образуя аддукты: N-(дезоксигуанозин-8-ил)-4-аминохинолин-1-оксид, 3-(дезоксигуанозин-N2-ил)-4-аминохинолин-1-оксид и 3-(дезоксаденозин-N6-ил)-4-аминохинолин-1-оксид; которые блокируют синтез ДНК, вызывая образование разрывов, в результате чего индуцируется SOS-ответ и растёт частота мутаций вследствие ошибок репарации ДНК [Ikenaga *et al.*, 1975].

Фурацилин (нитрофурал; семикарбазон 5-нитрофурфурола) восстанавливается клеточными нитроредуктазами с образованием аддуктов N2-фурфурил-дезоксигуанозин. Данный аддукт может блокировать репликацию высокоточными ДНК-полимеразами, такими как фрагмент Кленова dPol I в *E. coli* (Jarosz *et al.*, 2006). Что в свою очередь приведет к искажению зарождающейся пары оснований в активном центре [Jarosz *et al.*, 2006].

Наибольший ответ наблюдался при действии фурацилина на предварительно дейтерированные клетки штамма *E. coli* MG1655 (pColD::*lux*), который люминесцирует в ответ на серьезные и стойкие повреждения ДНК, когда системы репарации уже не способны справиться с повреждениями.

### 3.3.1.5 Ингибиторы ДНК-гиразы

Влияние D<sub>2</sub>O на ДНК-повреждающее действие ингибиторов ДНК-гираз изучалось с применением в качестве индукторов SOS-ответа 2 противомикробных препаратов, подавляющих активность бактериальной ДНК-гиразы: налидиксовой кислоты (10<sup>-3</sup> моль/л) и ципрофлоксацина (5×10<sup>-6</sup> моль/л).

При предварительном дейтерировании клеток биосенсоров PRecA, PDinI и PColD в течение 90 минут наблюдалось повышение уровня люминесценции, индуцированной налидиксовой кислотой (таблица 11). Наибольшие значения показателя D зафиксированы для штамма PColD (1,68-2,36) и PDinI (1,52-1,97) с максимальным потецирующим 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. При дейтерировании клеток используемых биосенсоров в среде с совместным содержанием D<sub>2</sub>O и налидиксовой кислоты значимое повышение уровня люминесценции дейтерированной культуры относительно недейтерированного контроля наблюдалось при содержании 9% D<sub>2</sub>O в среде культивирования для штамма PRecA (D=1,07) и 9-10% D<sub>2</sub>O для PDinI (D=1,04) (таблица 12).

Таблица 11. Значения показателя модифицирующего действия дейтерия на ДНК-повреждающую активность ингибиторов ДНК-гираз при предварительном дейтерировании биосенсоров PColD, PRecA и PDinI в течение 90 минут (серым выделены значения, не превысившие уровень значимости  $p < 0,05$ ).

PColD				PRecA				PDinI			
D <sub>2</sub> O <sub>5%</sub>	7,5%	9%	10%	5%	7,5%	9%	10%	5%	7,5%	9%	10%
Налидиксовая кислота, 10 <sup>-3</sup> моль/л											
1,68	2,31	2,36	2,21	1,33	1,40	1,24	1,05	1,52	1,80	1,97	1,85
Ципрофлоксацин, 5x10 <sup>-6</sup> моль/л											
0,93	0,87	0,88	0,91	0,96	0,96	0,88	0,84	0,96	0,91	0,89	0,86

В случае индукции люминесценции ципрофлоксацином как при предварительном дейтерировании клеток биосенсоров PRecA, PDinI и PColD, так и в случае культивирования клеток в среде с совместным содержанием D<sub>2</sub>O и генотоксиканта, обнаружено снижение уровня люминесценции дейтерированной культуры относительно недейтерированного контроля (таблица 11, таблица 12). Значения D наблюдались в диапазоне 0,84-0,96 для

предварительного дейтерирования и 0,74-0,96 для дейтерирования в присутствии индуктора.

Ингибиторы ДНК-гираз, использованные в данном исследовании: налидиксовая кислота и ципрофлоксацин, относятся к группе 4-хинолонов и являются очень мощными антибактериальными агентами широкого спектра действия [Hooper and Wolfson, 1985; Wolfson and Hooper, 1985]. Также они обладают бактерицидным действием при концентрациях выше минимальной ингибирующей концентрации [Smith, 1984; Barry *et al.*, 1987]. Бактерицидная активность 4-хинолонов против *Escherichia coli* базируется на трех независимых механизмах бактерицидного действия А, В и С.

Таблица 12. Значения показателя модифицирующего действия дейтерия на ДНК-повреждающую активность ингибиторов ДНК-гираз при инкубации биосенсоров PColD, PRecA и PDinI в среде с совместным содержанием дейтерия и индуктора (серым выделены значения, не превысившие уровень значимости  $p < 0,05$ ).

PCoID				PRecA				PDinI			
D <sub>2</sub> O <sub>5%</sub>	7,5%	9%	10%	5%	7,5%	9%	10%	5%	7,5%	9%	10%
Налидиксовая кислота, 10 <sup>-3</sup> моль/л											
0,95	1,00	0,97	0,86	1,04	1,04	1,07	1,00	1,09	1,01	1,04	1,04
Ципрофлоксацин, 5x10 <sup>-6</sup> моль/л											
0,82	0,93	0,89	0,74	1,00	0,97	0,96	1,00	0,89	0,88	0,95	0,96

Механизм А, свойственный всем 4-хинолонам, является единственным бактерицидным механизмом, проявляющимся у первого поколения данных антибиотиков, таких как налидиксовая кислота [Smith, 1984]. Синтез белка и РНК в делящихся бактериальных клетках необходим для реализации механизма А, что было показано в экспериментах с хлорамфениколом и рифампицином, когда эти препараты полностью устраняли бактерицидную активность налидиксовой кислоты против *E. coli* [Dietz *et al.*, 1966; Smith, 1984; Pohlhaus *et al.*, 2008].

Для второго поколения 4-хинолонов (ципрофлоксацин) характерно наличие механизма бактерицидного действия В, бактерицидный эффект которого на клетки *E. coli* уменьшали, но не устраняли бактериостатические концентрации как хлорамфеникола, так и рифампицина [Smith, 1984; Ratcliffe and Smith, 1984]. Позже было показано, что механизм В активен против неделящихся бактерий [Zeiler and Grohe, 1984; Chalkley and Koornhof, 1985]. В дальнейшем с использованием электрохимических, спектроскопических и атомно-силовых микроскопов показано, что ципрофлоксацин взаимодействует с белком внешней мембраны F *E. coli* (OmpF), индуцируя деформацию клеточной стенки, а при высоких концентрациях вызывает лизис клеточной мембраны [Ipte and Satpati, 2020].

В настоящем исследовании налидиксовая кислота (механизм А) повышала уровень люминесценции предейтерированных биосенсоров относительно недедейтерированного контроля в 1,24-2,36 раз, в то время как ципрофлоксацин (механизм А и В) снижал уровень люминесценции, независимо от режима дейтерирования сенсорных штаммов. Таким образом, для ингибиторов ДНК-гираз, различающихся механизмами бактерицидного действия, наблюдался разный эффект дейтерирования.

Налидиксовая кислота ингибирует активность ДНК-гиразы, стабилизируя расщепляющий комплекс, который состоит из топоизомеразы, связанной фосфотирозиновыми связями с обоими 5'-концами двухцепочечного разрыва ДНК. Хотя комплекс расщепления содержит латентный двуцепочечный разрыв, он связывается ковалентно присоединенным ферментом, и интактная ДНК восстанавливается, когда фермент завершает цикл реакции и диссоциирует [Pohlhaus *et al.*, 2008]. Однако репликационные вилки в местах стабилизированных налидиксовой кислотой комплексов расщепления блокируются [Pohlhaus and Kreuzer, 2005], что приводит к накоплению двуцепочечных разрывов в ДНК и индукции ими

SOS-ответа RecBC-зависимым способом [McPartland *et al.*, 1980; Myers, and Stahl, 1994].

### 3.3.1.6 Вещества, инициирующие свободнорадикальное окисление

С целью исследования влияния оксида дейтерия на ДНК-повреждающее действие веществ, инициирующих свободнорадикальное окисление, индуцировали SOS-ответ штаммов-биосенсоров *E. coli* K12 MG1655 PRecA, PDinI и PColD применением диоксидина ( $10^{-5}$  моль/л) и  $H_2O_2$  ( $2,5 \times 10^{-4}$  моль/л) у клеток, дейтерированных в среде с содержанием  $D_2O$  5, 7,5, 9 и 10%.

Таблица 13. Значения показателя модифицирующего действия дейтерия на ДНК-повреждающую активность веществ, инициирующих свободнорадикальное окисление (диоксидина и  $H_2O_2$ ), при предварительном дейтерировании биосенсоров PColD, PRecA и PDinI в течение 90 минут (серым выделены значения, не превысившие уровень значимости  $p < 0,05$ ).

PColD				PRecA				PDinI			
$D_2O_{5\%}$	7,5%	9%	10%	5%	7,5%	9%	10%	5%	7,5%	9%	10%
Диоксидин, $10^{-5}$ моль/л											
1,43	1,54	1,57	1,36	0,93	0,95	0,95	1,02	1,10	1,16	1,17	0,98
$H_2O_2$ , $2,5 \times 10^{-4}$ моль/л											
0,99	1,17	1,06	1,02	0,96	1,08	1,08	1,10	0,97	1,02	1,10	1,11

Предварительное дейтерирование биосенсоров в течение 90 минут повышало индуцированную диоксидином люминесценцию штаммов PColD и PDinI (таблица 13). Значения показателя D при этом наблюдались в диапазоне 1,36-1,57 для PColD и 1,10-1,17 для PDinI с максимальным потенцирующим эффектом дейтерия при содержании 9%  $D_2O$  в среде культивирования (PColD: D=1,57; PDinI: D=1,17). Увеличение уровня люминесценции предейтерированных клеток относительно недедейтерированного контроля также зафиксировано в случае  $H_2O_2$ , превысив

уровень значимости  $p < 0,05$  при культивировании бактерий PColD в среде с содержанием 7,5% D<sub>2</sub>O (D=1,17) и PRecA с 9, 10% D<sub>2</sub>O (D=1,08 и 1,10, соответственно).

При дейтерировании биосенсоров в среде с совместным содержанием D<sub>2</sub>O и диоксидина (таблица 14) наблюдались значимые изменения интенсивности люминесценции штамма PRecA при наличии 10% D<sub>2</sub>O (D=0,90) и PDinI при 5% D<sub>2</sub>O (D=1,15). Индуцированная H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> люминесценция снижалась у дейтерированных в присутствии индуктора клеток штамма PColD на всем диапазоне использованных концентраций D<sub>2</sub>O (диапазон значений D 0,69-0,73) и клеток PRecA при содержании 5% D<sub>2</sub>O в среде инкубации (D=0,85).

Таблица 14. Значения показателя модифицирующего действия дейтерия на ДНК-повреждающую активность диоксидина и H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> при инкубации биосенсоров PColD, PRecA и PDinI в среде с совместным содержанием дейтерия и индуктора (серым выделены значения, не превысившие уровень значимости  $p < 0,05$ ).

PColD				PRecA				PDinI			
D <sub>2</sub> O <sub>5%</sub>	7,5%	9%	10%	5%	7,5%	9%	10%	5%	7,5%	9%	10%
Диоксидин, 10 <sup>-5</sup> моль/л											
0,98	0,92	0,99	1,12	0,98	0,97	0,96	0,90	1,15	1,04	1,06	1,05
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , 2,5x10 <sup>-4</sup> моль/л											
0,73	0,69	0,71	0,70	0,85	0,91	0,99	0,90	0,93	0,93	0,91	0,83

Диоксидин (1,4-ди-N-оксид 2,3-бис-(гидрокси-метил)хиноксалина), антибактериальный препарат широкого спектра действия, также используется в качестве прооксидантного генотоксического агента. Диоксидин ферментативно восстанавливается *in vivo* с образованием радикального промежуточного соединения, которое вызывает разрывы нитей ДНК. Расщепление ДНК также опосредуется гидроксильным радикалом, образующимся в результате гомолитической фрагментации радикала

лекарственного средства [Zhanataev *et al.*, 2022]. Обработка бактериальных клеток диоксидином приводит к мгновенному ингибированию синтеза ДНК и образованию одноцепочечных разрывов в молекуле ДНК [Bakaï and Fonshteïn, 1987].

В клетке *Escherichia coli* при обработке  $H_2O_2$  также происходит накопление одноцепочечных разрывов в ДНК в результате развития окислительного стресса, вследствие чего клетка может погибнуть. Повреждения, опосредованные окислительным стрессом, могут быть репарированы различными путями: эксцизионной репарацией оснований, эксцизионной репарацией нуклеотидов и гомологичной рекомбинацией [Dhawale *et al.*, 2021].

Наибольший потенцирующий эффект дейтерирования наблюдался при инкубации клеток биосенсора *E.coli* MG1655 (pColD::*lux*) с диоксидином. Для  $H_2O_2$  небольшое превышение уровня люминесценции относительно недейтерированного контроля зафиксировано лишь в нескольких вариантах эксперимента. Однако, как будет показано ниже (таблица 17), при перерасчете люминесценции на количество жизнеспособных клеток при индукции  $H_2O_2$  экспрессии гена *recA* также наблюдается потенцирующий эффект дейтерирования.

Таким образом, при общем анализе групп наибольший потенцирующий эффект  $D_2O$  обнаружен для групп генотоксикантов, образующих аддукты с ДНК, и веществ, ведущих к образованию межнитевых и внутринитевых сшивок ДНК. Максимальный эффект  $D_2O$  обнаружен при индукции SOS-ответа фурацилином у штаммов PColD (D=4,03) при содержании 7,5%  $D_2O$  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  $D_2O$  в условиях предейтерирования. Наибольший потенцирующий эффект  $D_2O$  зафиксирован на штамме PColD (10%  $D_2O$ ) при значениях показателя D 1,86-2,08. Увеличение люминесценции дейтерированных культур относительно недедейтерированного 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%  $D_2O$ . Биосенсор PRecA демонстрировал минимальный эффект предейтерирования на индуцированный SOS-ответ митомицином С и *цис*-платины при концентрации  $D_2O$  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%  $D_2O$ . 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 недедейтерированного контроля клеток всех используемых штаммов. Наибольший потенцирующий эффект предейтерирования зафиксирован у штамма PDinI при содержании 9%  $D_2O$  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).

Исследуемые красители, интеркалирующие в ДНК: бромистый этидий и 9-АА, продемонстрировали разный уровень ответа на биосенсорах. Таким образом, бромистый этидий не индуцировал значимо отличающийся от спонтанного уровень люминесценции всех трех штаммов при инкубации с клетками в течение 90 минут. Вследствие чего для изучения эффекта дейтерирования использовался только 9-АА ( $5 \times 10^{-2}$  моль/л). При воздействии данного интеркалирующего агента на предейтерированную культуру наблюдалось значимое снижение уровня люминесценции используемых биосенсоров, и показатель модифицирующего действия D варьировал в диапазоне 0,67-0,88; с самым низким показателем на штамме PRecA при концентрации 10% D<sub>2</sub>O в среде инкубации и наибольшим значением при инкубации PColD с 7,5% D<sub>2</sub>O. Дейтерирование клеток *E.coli* в среде с совместным присутствием D<sub>2</sub>O и 9-АА значимо понижало люминесценцию штамма PRecA (значение D составило 0,62-0,88). Уровень ответа биосенсора PDinI, инкубированного в тех же условиях, значимо отличался от недейтерированного контроля при 7,5% (D=1,19) и 10% D<sub>2</sub>O (D=1,54). Для штамма PColD при режиме дейтерирования в присутствии 9-АА значимых различий с контролем не выявлено.

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).

Экспрессия генов SOS-регулона происходит поочередно. Сначала экспрессируются гены эксцизионной репарации нуклеотидов, далее начинается экспрессия генов *recA* и *recN*, продукты которых участвуют в

рекомбинации. Если после индукции первых SOS-генов в ДНК все еще остаются повреждения, начинается экспрессия генов *umuD* и *umuC*, кодирующих ДНК-полимеразу V (мутасому), и генов, кодирующих колицины, индукция которых ведёт к лизису клетки. Это происходит по оценочным данным примерно через 40 минут после индукции первых SOS-генов. Таким образом, используемые нами биосенсоры MG1655 (pRecA::*lux*) и MG1655 (pColD::*lux*) отражают экспрессию стартового и терминального генов SOS-регулона в ответ на повреждение ДНК генотоксикантами.

Анализ полученных 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.

Максимальные значения величины потенцирующего действия оксида дейтерия наблюдались при концентрации D<sub>2</sub>O в среде, равной 7,5%, тогда как при концентрации D<sub>2</sub>O 10% происходило снижение люминесценции биосенсоров. Возможно, это обусловлено влиянием D<sub>2</sub>O на активность белков системы люминесценции или же синергизмом токсического действия D<sub>2</sub>O и генотоксикантов.

Следует обратить внимание на то, что 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. Одним из наиболее простых возможных объяснений этого может быть повышенная прочность связи

генотоксикант–ДНК в дейтерированных участках взаимодействующих молекул. Возможно также, что дейтерирование снижает активность 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.

В присутствии используемых в данной работе химических генотоксикантов эти последствия замены протия на дейтерий вызвали увеличение уровня транскрипции с промоторов генов, контролирующих процессы репликации, рекомбинации и репарации, приведя к увеличению уровня люминесценции в использованных тест-системах. Добавление дейтерия в отсутствие генотоксикантов не вызвали отклика тест-систем для определения мутагенности воздействия. Таким образом, сам по себе дейтерий, если и обладает мутагенным эффектом, то его величина не превышает уровня чувствительности использованной нами тест-системы.

Одним из наиболее простых объяснений наблюдаемого изотопного эффекта дейтерия в описанных выше результатах может быть повышенная прочность связи генотоксикант–ДНК в дейтерированных участках взаимодействующих молекул. Возможно также, что дейтерирование уменьшает активность ферментов репарации, приводя к снижению скорости

устранения повреждений ДНК и сдвигу баланса между скоростью их накопления и скоростью восстановления исходной структуры ферментами репарационной системы. Данное предположение приложимо для объяснения потенцирующего действия дейтерия на SOS-ответ, индуцированный генотоксикантами. Однако специфичность и механизмы индукции адаптивного ответа в корне отличаются от таковых при SOS-ответе.

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

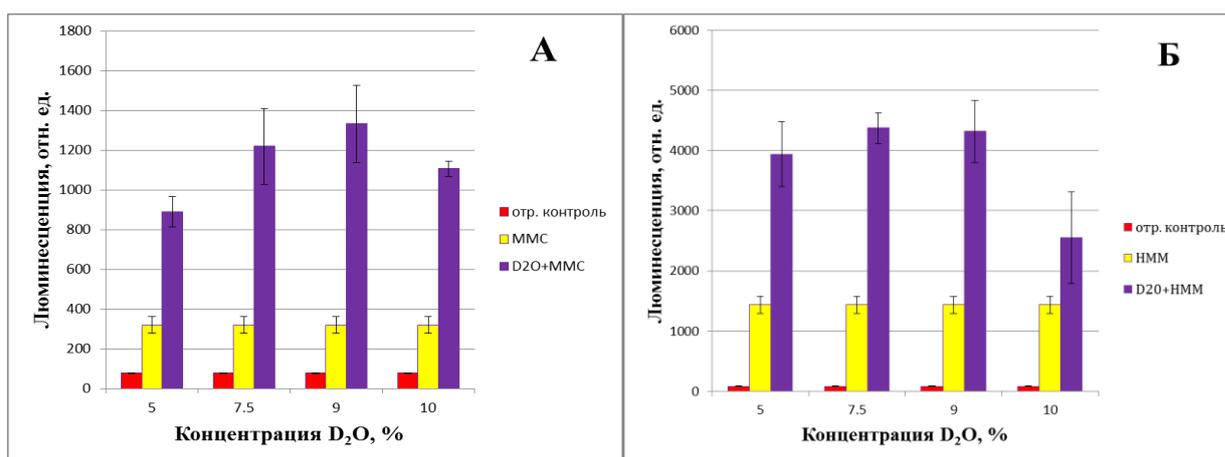
Модифицирующий эффект оксида дейтерия исследовался на биосенсоре *E. coli* K12 MG1655 (pAlkA::lux) с использованием в качестве индукторов экспрессии гена *alkA* алкилирующих соединений: ММС, НММ (рис. 14) и стрептозотоцина. Экспозиция клеток биосенсора в среде с совместным присутствием алкилирующего агента и D<sub>2</sub>O не приводила к значимому повышению уровня люминесценции (таблица 15). 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. 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.

На культуре, дейтерированной 9% D<sub>2</sub>O, активность ММС в концентрации 5x10<sup>-4</sup> моль/л повышалась в 5,5 раз по сравнению с активностью на недейтерированной 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 недейтерированной. Стрептозотоцин, производное НММ, демонстрировал меньшую эффективность, повышая люминесценцию дейтерированных клеток биосенсора PAlkA в диапазоне значений 1,41-1,87.

Прямая репарация алкилированных оснований 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, который ковалентно перемещает алкильную группу с повреждённой ДНК на один из двух своих метильных акцепторов [Sedgwick *et al.*, 2007].

**Таблица 15.** Модифицирующее действие дейтерия на активность алкилирующих агентов на биосенсоре PA1kA (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 $6,2 \times 10^{-4}$
Стрептозоцин, $10^{-5}$	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 $8,7 \times 10^{-1}$



**Рисунок 14.** Влияние предварительного дейтерирования на индукцию ММС и НММ экспрессии гена *alkA*.

НММ и ММС относятся к разным группам алкилирующих агентов ( $SN_1$  и  $SN_2$  соответственно). НММ метилирует атом кислорода в молекулах гуанина и тимина, ММС преимущественно метилирует  $N_1$ -аденин и  $N_3$ -цитозин в однострессовой ДНК. Вместе с тем при воздействии на двунитевую ДНК ММС и НММ в 70-80 % случаев метилируют  $N_7$ -позицию гуанина, который удаляется путём спонтанной депуринизации. Образовавшийся в итоге апуриновый сайт подвергается ферментативной репарации. Вторым по частоте образования продуктом алкилирования двунитевой ДНК является  $N_3$ -метиладенин, приводящий к блокированию репликации ДНК. Метилированный аденин удаляется 3-метиладенин-ДНК-гликозилазой, продуктом гена *adaA*, экспрессия которого контролируется белком Ada [Lindahl *et al.*, 1988; Saget *et al.*, 1998; Sedgwick *et al.*, 2007]. Таким образом, уровень экспрессии гена *adaA*, регистрируемый по люминесценции биосенсора *E. coli* K12 MG1655 (pAlkA::*lux*), отражает уровень индукции белка Ada в ответ на алкилирование.

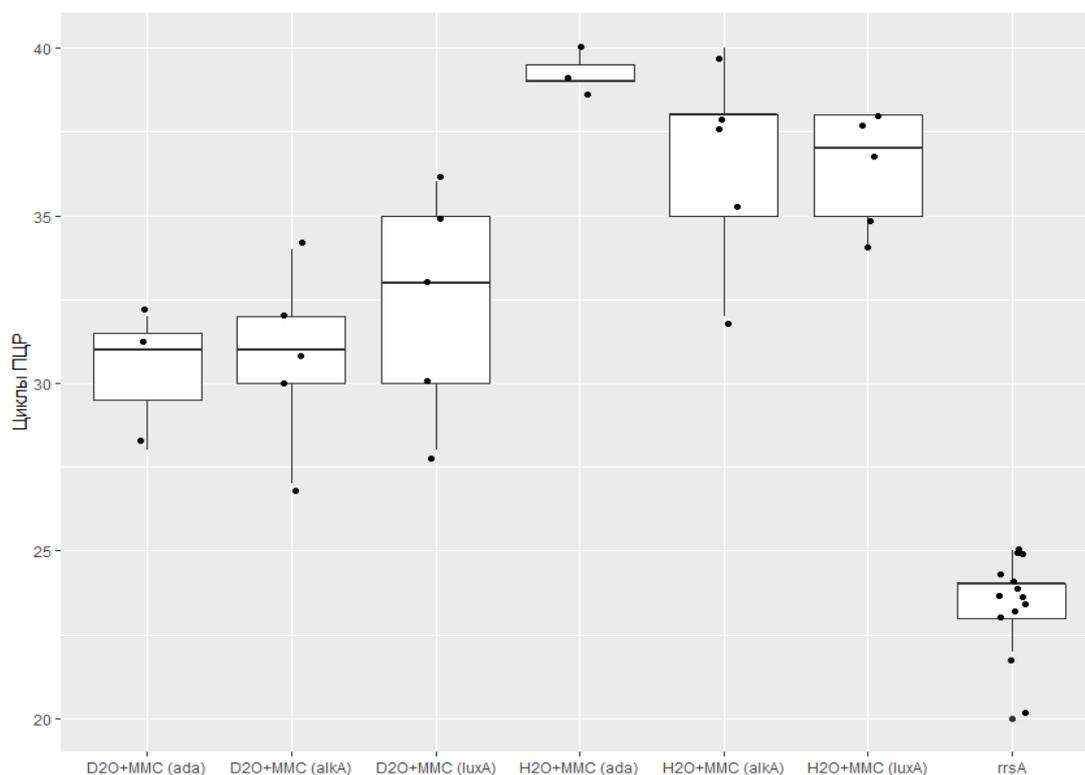
Белку Ada присущи две функции – репарационная (репарация  $O_6$ -алкилгуанина и  $O_4$ -метилтимина) и регуляторная, усиление транскрипции четырех генов *ada*-регулона – *ada*, *alkA*, *alkB* и *aid*. Белок имеет два домена на концевых участках: N-Ada и C-Ada, которые определяют репарационную активность Ada: цистеин, активированный цинком, домена N-Ada переносит метил из фосфорного остатка ДНК на свой цистеиновый остаток Cys20, а домен C-Ada переносит на свой Cys321 метил из  $O_6$ -алкилгуанина [Landini and Volkert, 2000].

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. Показано, что алкилирование N-Ada домена приводит к усилению его аффинности к ДНК от 100 до 1000 раз [Mielecki *et al.*, 2015]. 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.

### **3.3.3 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.15). Как видно из рис.15, 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 недейтерированных 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, и подтверждают описанные выше результаты, полученные путем измерения люминесценции биосенсора *E. coli* K12 MG1655 (pAlkA::*lux*).



**Рисунок 15.** Распределение показателей экспрессии генов *luxA*, *alkA* и *ada* в клетках дейтерированных и недеитированных бактерий *E.coli*, индуцированной MMC (экспрессия референсного гена *rrs* не зависела от дейтерирования бактерий).

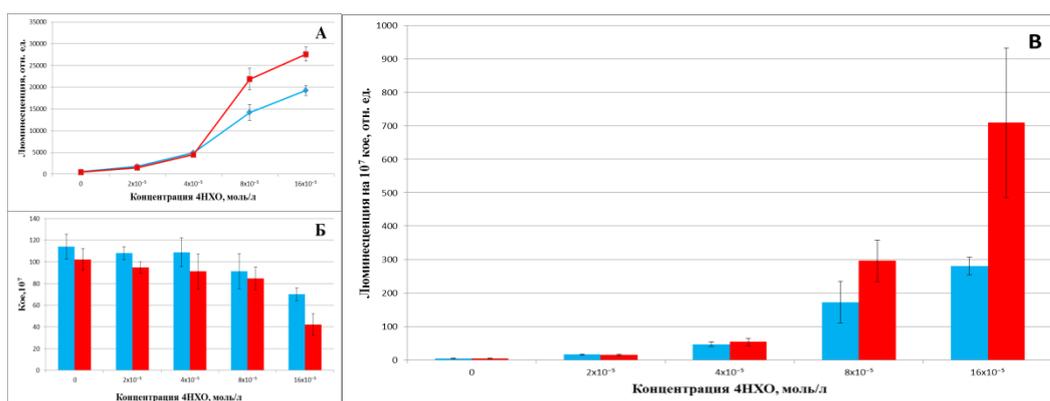
### 3.4 Анализ влияния токсичности на результаты люминесценции биосенсора *E.coli* MG1655 (pRecA::*lux*)

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%. В рамках данного исследования получены результаты потенцирующего действия дейтерия на индукцию SOS-ответа 4-НХО в концентрации  $8 \times 10^{-5}$  моль/л, для  $H_2O_2$  в концентрации  $2,5 \times 10^{-4}$  моль/л и УФ облучения в дозе  $60 \text{ Дж/м}^2$  значимых изменений люминесценции дейтерирование не вызвало.

#### 3.4.1 Исследование совместной токсичности $D_2O$ и 4-НХО

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 недейтерированной культуры от концентрации индуктора представлена на рис.16А. Наличие оксида дейтерия в инкубационной среде значительно снижало выживаемость клеток только при максимальной, из протестированных, концентрации 4-НХО  $1,6 \times 10^{-6}$  моль/л (рис.16Б). В выживших клетках уровень люминесценции на кое был выше в дейтерированной культуре при концентрации 4-НХО  $1,6 \times 10^{-6}$  моль/л (рис.16В).



**Рисунок 16.** 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 – недейтерированная культура, красный – дейтерированная.

### 3.4.2 Исследование совместной токсичности $D_2O$ и УФ

В контрольном варианте эксперимента (без  $D_2O$ ) 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%  $D_2O$  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.16 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<sup>7</sup> 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.

**Таблица 16 .** Показатели люминесценции и выживаемости бактерий биосенсора PColD, облученного УФ-светом в дозе 12 Дж/м<sup>2</sup> и инкубированного в течение 90 мин в питательной среде без и с D<sub>2</sub>O в концентрации 10%.

Облучение УФ, Дж/м <sup>2</sup>	0		90		180		270	
	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.	27 976,4 ± 1 304,7*	22 442,8 ± 1 726,6	51 179,5 ± 4 138,5	32 218,8 ± 4 278,0	44 866,4 ± 2 338,0	28 290,4 ± 3 726,4	38 606,5 ± 1 044,8	32 111,3 ± 1 671,9
Кое/мл, 10 <sup>7</sup>	293,4 ± 33,3	190,1 ± 20,9	261,1 ± 12,0	144,8 ± 8,2	93,5 ± 5,5	38,1 ± 1,8	42,1 ± 2,3	21,9 ± 2,5
Люминесценция на 10 <sup>7</sup> кое, отн. ед.	103,4 ± 10,7	129,6 ± 19,1	203,0 ± 24,9	222,1 ± 26,1	498,5 ± 49,0	766,9 ± 122,8	933,4 ± 49,2	1625,3 ± 232,2

### 3.4.3 Исследование совместной токсичности D<sub>2</sub>O и H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

Результаты для перекиси водорода представлены в табл.17. 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  $\text{H}_2\text{O}_2$  экспрессии гена *recA*.

Таким образом, результаты исследования совместной токсичности  $\text{D}_2\text{O}$  и индукторов SOS-ответа: 4-НХО,  $\text{H}_2\text{O}_2$  и УФ, также свидетельствуют об увеличении уровня индуцированного SOS-ответа в предварительно дейтерированных клетках *E. coli*.

**Таблица 17.** 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

## 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, ММС, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 9АА, 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 ММС; 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 предейтерирования 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, *цис*-платины, налидиксовой кислоты и 2-аминопурина, диоксида на штамме PColD, а также ММС и УФ в клетках биосенсора PDinI. В режиме совместного с генотоксикантом дейтерирования *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, ММС 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  $H_2O_2$  и УФ в выживших клетках.

## ВЫВОДЫ

1. Впервые проведено исследование влияния преварительного 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 ЛИТЕРАТУРЫ**

1. Абилов, С. К., и Глазер, В. М. (2013). Генетическая токсикология: итоги и проблемы. *Генетика*, 49(1), 81-81.
2. Завильгельский, Г. Б., Котова, В. Ю., и Манухов, И. В. (2012). Сенсорные биолюминесцентные системы на основе lux-оперонов для детекции токсичных веществ. *Химическая физика*, 31(10), 15-15.
3. Игонина, Е. В., Марсова, М. В., и Абилов, С. К. (2016). Lux-биосенсоры: скрининг биологически активных соединений на генотоксичность. *Экологическая генетика*, 14(4).
4. Котова, В. Ю., Манухов, И. В., и Завильгельский, Г. Б. (2009). Lux-биосенсоры для детекции SOS-ответа, теплового шока и окислительного стресса. *Биотехнология*, (6), 16-25.
5. Котова, В. Ю., Рыженкова, К. В., Манухов, И. В., и Завильгельский, Г. Б. (2014). Индуцируемые специфические lux-биосенсоры для детекции антибиотиков: конструирование и основные характеристики. *Прикладная биохимия и микробиология*, 50(1), 112-112.
6. Кудеевская, Е. М., Сазыкин, И. С., Хаммами, М. И., Селиверстова, Е. Ю., и Сазыкина, М. А. (2015). Генотоксичность атмосферных осадков г. Ростова-на-Дону. *Валеология*, (3), 52-58.
7. Омельченко, Т. В., Кхатаб, З. С., Шерстнев, А. К., Сазыкина, М. А., Вардуни, Т. В., и Шиманская, Е. И. (2011). Оценка генотоксичности окружающей среды г. Ростова-на-Дону с использованием растительных и бактериальных тест-систем. *Экология урбанизированных территорий*, (3), 94-101.
8. Сазыкина, М. А., Новикова, Е. М., Кхатаб, З. С., Чистяков, В. А., и Сазыкин, И. С. (2012). Токсичность почв городов Ростовской области. *Теоретическая и прикладная экология*, (2), 76-81.
9. Сазыкина, М. А., Чистяков, В. А., Сазыкин, И. С., Лагутова, Л. П., Новикова, Е. М., и Латышев, А. И. (2010). Использование

бактериального lux-биосенсора для детекции загрязнения природных вод ртутью. Вода: химия и экология, (5), 24-29.

10. Сазыкина, М. А., Чистяков, В. А., Сазыкин, И. С., Новикова, Е. М., Кхатаб, З. С., Лагутова, Л. П., и Латышев, А. В. (2011). Генотоксичность воды родников г. Ростова-на-Дону (2009). Известия высших учебных заведений. Северо-Кавказский регион. Естественные науки, (2), 44-46.
11. Ушаков, В. Ю. (2010). Sos-система репарации ДНК у бактерий (обзор). Вестник Пермского университета. Серия: Биология, (2), 19-30.
12. Abrahamsson, S., Dinh-Nguyen, N., Hellgren, L.G., and Vincent, J.G. (1982). Patent SE 426011B.
13. Adams, W. H., and Adams, D. G. (1988). Effects of deuteration on hematopoiesis in the mouse. The Journal of pharmacology and experimental therapeutics, 244(2), 633–639.
14. Ahn, J. M., Hwang, E. T., Youn, C. H., Banu, D. L., Kim, B. C., Niazi, J. H., and Gu, M. B. (2009). Prediction and classification of the modes of genotoxic actions using bacterial biosensors specific for DNA damages. Biosensors & bioelectronics, 25(4), 767–772.
15. Akimaru, H., Sakumi, K., Yoshikai, T., Anai, M., and Sekiguchi, M. (1990). Positive and negative regulation of transcription by a cleavage product of Ada protein. Journal of molecular biology, 216(2), 261–273.
16. Aldhous, P. (1995). Heavy water helps vaccines keep cool. New Sci. 151: 22.
17. Andjus, P. R., and Vucelić, D. (1990). D<sub>2</sub>O-induced cell excitation. The Journal of membrane biology, 115(2), 123–127.
18. Andjus, P. R., Kataev, A. A., Alexandrov, A. A., Vucelić, D., and Berestovsky, G. N. (1994). D<sub>2</sub>O-induced ion channel activation in Characeae at low ionic strength. The Journal of membrane biology, 142(1), 43–53.

19. Archakov, A. I., Bachmanova, G. I., and Zhukov, A. A. (1990). Cytochrome P-450 and active oxygen (pp. 339-339). London: Taylor & Francis.
20. Audi, G., Bersillon, O., Blachot, J., Wapstra, A. H. (2003). The NUBASE evaluation of nuclear and decay properties. *Nuclear Physics A*.
21. Avery, M. A., Bonk, J. D., and Mehrotra, S. (1996). Deuterated antimalarials: Synthesis of trideutero-artemisinin, dihydroartemisinin, and arteether. *Journal of Labelled Compounds and Radiopharmaceuticals*, 38(3), 249-254.
22. Bachor, R., Shea, C. R., Gillies, R., and Hasan, T. (1991). Photosensitized destruction of human bladder carcinoma cells treated with chlorin e6-conjugated microspheres. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 88(4), 1580–1584.
23. Bakaï, T. S., & Fonshteïn, L. M. (1987). Kharakter povrezhdeniï DNK i ikh likvidatsii pri deïstvii dioksidina na bakterii [The nature of DNA damage and its repair after treatment of bacteria with dioxidine]. *Molekuliarnaia genetika, mikrobiologiiia i virusologiiia*, (4), 35–39.
24. Baker, M. T., Ronnenberg, W. C., Jr, Ruzicka, J. A., Chiang, C. K., and Tinker, J. H. (1993). Inhibitory effects of deuterium substitution on the metabolism of sevoflurane by the rat. *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals*, 21(6), 1170–1171.
25. Barry, A. L., Gardiner, R. V., & Packer, R. R. (1987). Bactericidal activities of ten different fluoroquinolones against selected Enterobacteriaceae. *Diagnostic microbiology and infectious disease*, 6(1), 81–83. [https://doi.org/10.1016/0732-8893\(87\)90119-2](https://doi.org/10.1016/0732-8893(87)90119-2)
26. Basov, A., Fedulova, L., Baryshev, M., and Dzhimak, S. (2019). Deuterium-depleted water influence on the isotope  $^2\text{H}/^1\text{H}$  regulation in body and individual adaptation. *Nutrients*, 11(8), 1903.

27. Bauer, A. L., Jachimczak, P., Blesch, A., and Baur, J. (1995). Selective Killing and Growth Arrest of Malignant Tumor Cells by Deuterium Oxide (D<sub>2</sub>O). *Tumordiagnostik und therapie*, 16(2), 61-61.
28. Baum, D., Dobbing, J., and Coward, W. A. (1979). Deuterium method for measuring milk intake in babies. *Lancet (London, England)*, 2(8137), 309.
29. Bell, J. C., and Kowalczykowski, S. C. (2016). RecA: Regulation and Mechanism of a Molecular Search Engine. *Trends in biochemical sciences*, 41(6), 491–507.
30. Bell, J. C., Plank, J. L., Dombrowski, C. C., and Kowalczykowski, S. C. (2012). Direct imaging of RecA nucleation and growth on single molecules of SSB-coated ssDNA. *Nature*, 491(7423), 274–278.
31. Bennett, R. A., & Pegg, A. E. (1981). Alkylation of DNA in rat tissues following administration of streptozotocin. *Cancer research*, 41(7), 2786–2790.
32. Beranek D. T. (1990). Distribution of methyl and ethyl adducts following alkylation with monofunctional alkylating agents. *Mutation research*, 231(1), 11–30. [https://doi.org/10.1016/0027-5107\(90\)90173-2](https://doi.org/10.1016/0027-5107(90)90173-2)
33. Bolzán, A. D., and Bianchi, M. S. (2002). Genotoxicity of streptozotocin. *Mutation research*, 512(2-3), 121–134.
34. Boon, T. (1971). Inactivation of ribosomes in vitro by colicin E 3 . *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 68(10), 2421–2425.
35. Braman, V., Graham, P., Cheng, C., Turnquist, D., Harnett, M., Sabounjian, L., and Shipley, J. (2013). A Randomized Phase I Evaluation of CTP-499, a Novel Deuterium-Containing Drug Candidate for Diabetic Nephropathy. *Clinical pharmacology in drug development*, 2(1), 53–66.
36. Bulich, A. A. (1979) Use of luminescent bacteria for determining toxicity in aquatic environments, in *Aquatic Toxicology*. American Society for

- Testing and Materials (Markings, L. L., and Kimerleeds, R. A., eds.) Philadelphia, p. 8.
37. Capaldo, F. N., Ramsey, G., and Barbour, S. D. (1974). Analysis of the growth of recombination-deficient strains of *Escherichia coli* K-12. *Journal of bacteriology*, 118(1), 242–249.
38. Capucci, M. S., Hoffmann, M. E., De Groot, A., & Natarajan, A. T. (1995). Streptozotocin-induced toxicity in CHO-9 and V79 cells. *Environmental and molecular mutagenesis*, 26(1), 72–78. <https://doi.org/10.1002/em.2850260111>
39. Carlstedt, B. C., Crespi, H. L., Blake, M. I., and Katz, J. J. (1973). Biosynthesis of deuterated benzylpenicillins. 3. Relative antibiotic potency of highly deuterated benzylpenicillin. *Journal of pharmaceutical sciences*, 62(5), 856–857.
40. Cascales, E., Buchanan, S. K., Duché, D., Kleanthous, C., Llobès, R., Postle, K., Riley, M., Slatin, S., and Cavard, D. (2007). Colicin biology. *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR*, 71(1), 158–229.
41. Castell, J. V., Martínez, L. A., Miranda, M. A., and Tárrega, P. (1994). A general procedure for isotopic (deuterium) labelling of non-steroidal antiinflammatory 2-arylpropionic acids. *Journal of Labelled Compounds and Radiopharmaceuticals*, 34(1), 93-100.
42. Chalkley, L. J., & Koornhof, H. J. (1985). Antimicrobial activity of ciprofloxacin against *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, and *Staphylococcus aureus* determined by the killing curve method: antibiotic comparisons and synergistic interactions. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 28(2), 331–342. <https://doi.org/10.1128/AAC.28.2.331>
43. Chen, Z., Yang, H., and Pavletich, N. P. (2008). Mechanism of homologous recombination from the RecA-ssDNA/dsDNA structures. *Nature*, 453(7194), 489-4.
44. Clark, A. J., and Margulies, A. D. (1965). Isolation and characterization of recombination-deficient mutants of *Escherichia coli* K12. *Proceedings*

- of the National Academy of Sciences of the United States of America, 53(2), 451–459.
45. Cole R. S. (1973). Repair of DNA containing interstrand crosslinks in *Escherichia coli*: sequential excision and recombination. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 70(4), 1064–1068. <https://doi.org/10.1073/pnas.70.4.1064>
46. Courcelle, J., Khodursky, A., Peter, B., Brown, P. O., and Hanawalt, P. C. (2001). Comparative gene expression profiles following UV exposure in wild-type and SOS-deficient *Escherichia coli*. *Genetics*, 158(1), 41–64.
47. Cox, M. M. (2007). Motoring along with the bacterial RecA protein. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 8(2), 127–138.
48. Cox, M. M. (2007a). Regulation of bacterial RecA protein function. *Critical reviews in biochemistry and molecular biology*, 42(1), 41–63.
49. Craig, N. L., and Roberts, J. W. (1981). Function of nucleoside triphosphate and polynucleotide in *Escherichia coli* recA protein-directed cleavage of phage lambda repressor. *The Journal of biological chemistry*, 256(15), 8039–8044.
50. Crespi, H.L. (1982). The isolation of deuterated bacteriorhodopsin from fully deuterated *Halobacterium halobium*. *Methods Enzymol.* 88: 3–5.
51. Darbyshire, J. F., Gillette, J. R., Nagata, K., and Sugiyama, K. (1994). Deuterium isotope effects on A-ring and D-ring metabolism of testosterone by CYP2C11: evidence for dissociation of activated enzyme-substrate complexes. *Biochemistry*, 33(10), 2938–2944.
52. Davidov, Y., Rozen, R., Smulski, D. R., Van Dyk, T. K., Vollmer, A. C., Elsemore, D. A., LaRossa, R. A., and Belkin, S. (2000). Improved bacterial SOS promoter::lux fusions for genotoxicity detection. *Mutation research*, 466(1), 97–107.
53. Day, R. S., 3rd, Babich, M. A., Yarosh, D. B., & Scudiero, D. A. (1987). The role of O6-methylguanine in human cell killing, sister chromatid exchange induction and mutagenesis: a review. *Journal of cell science*.

Supplement, 6, 333–353.

[https://doi.org/10.1242/jcs.1984.supplement\\_6.22](https://doi.org/10.1242/jcs.1984.supplement_6.22)

54. De Graaf, F. K., Niekus, H. G., and Klootwijk, J. (1973). Inactivation of bacterial ribosomes in vivo and in vitro by cloacin DF13. *FEBS letters*, 35(1), 161–165.
55. Deitz, W. H., Cook, T. M., & Goss, W. A. (1966). Mechanism of action of nalidixic acid on *Escherichia coli*. 3. Conditions required for lethality. *Journal of bacteriology*, 91(2), 768–773. <https://doi.org/10.1128/jb.91.2.768-773.1966>
56. Deng, B., Lento, C., and Wilson, D. J. (2016). Hydrogen deuterium exchange mass spectrometry in biopharmaceutical discovery and development - A review. *Analytica chimica acta*, 940, 8–20.
57. Deraniyagala, S. A., Adediran, S. A., and Pratt, R. F. (1995). . beta.-Secondary and Solvent Deuterium Kinetic Isotope Effects and the Mechanisms of Base- and Acid-Catalyzed Hydrolysis of Penicillanic Acid. *The Journal of Organic Chemistry*, 60(6), 1619–1625.
58. Deshpande S. Principles of toxicology. *Handbook of food toxicology*. New York: Marcel Dekker; 2002. p. 11–40.
59. Dhawale, A., Bindal, G., Rath, D., & Rath, A. (2021). DNA repair pathways important for the survival of *Escherichia coli* to hydrogen peroxide mediated killing. *Gene*, 768, 145297. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2020.145297>
60. Dronkert, M. L., & Kanaar, R. (2001). Repair of DNA interstrand cross-links. *Mutation research*, 486(4), 217–247. [https://doi.org/10.1016/s0921-8777\(01\)00092-1](https://doi.org/10.1016/s0921-8777(01)00092-1)
61. Dzhimak, S. S., Basov, A. A., and Baryshev, M. G. (2015). Content of deuterium in biological fluids and organs: Influence of deuterium depleted water on D/H gradient and the process of adaptation. *Doklady. Biochemistry and biophysics*, 465, 370–373.

62. Ebina, Y., Kishi, F., and Nakazawa, A. (1982). Direct participation of *lexA* protein in repression of colicin E1 synthesis. *Journal of bacteriology*, 150(3), 1479–1481.
63. Edington, B. V., Whelan, S. A., and Hightower, L. E. (1989). Inhibition of heat shock (stress) protein induction by deuterium oxide and glycerol: additional support for the abnormal protein hypothesis of induction. *Journal of cellular physiology*, 139(2), 219–228.
64. Egelman, E. H., and Stasiak, A. (1993). Electron microscopy of RecA-DNA complexes: two different states, their functional significance and relation to the solved crystal structure. *Micron*, 24(3), 309-324.
65. Eisenberg, D., and Kauzmann, W. (1969). *The structure and properties of water*. Oxford University Press, New York.
66. Elsing, C., Hirlinger, A., Renner, E. L., Lauterburg, B. H., Meier, P. J., and Reichen, J. (1995). Solvent isotope effect on bile formation in the rat. *The Biochemical journal*, 307 (Pt 1), 175–181.
67. Fatemi, F., Golbodagh, A., Hojihosseini, R., Dadkhah, A., Akbarzadeh, K., Dini, S., and Malayeri, M. (2020). Anti-inflammatory effects of deuterium-depleted water plus *Rosa Damascena* Mill. essential oil via cyclooxygenase-2 pathway in rats. *Turkish journal of pharmaceutical sciences*, 17(1), 99–107.
68. Fernández De Henestrosa, A. R., Ogi, T., Aoyagi, S., Chafin, D., Hayes, J. J., Ohmori, H., and Woodgate, R. (2000). Identification of additional genes belonging to the *LexA* regulon in *Escherichia coli*. *Molecular microbiology*, 35(6), 1560–1572.
69. Ferraboschi, P., Grisenti, P., and Santanillo, E. (1994). A facile synthesis of pentadeuterated domiodol (2-iodomethyl-4-hydroxymethyl-1, 3-dioxolane) from glycerol-1, 1, 2, 3, 3-d<sub>5</sub>. *Journal of Labelled Compounds and Radiopharmaceuticals*, 34(3), 303-306.
70. Foster, A.B. (1984). Deuterium isotope effects in studies of drug metabolism. *TIPS*, 5: 524–527.

71. Foster, A.B. (1985). Deuterium isotope effects in the metabolism of drugs and xenobiotics: implications for drug design. *Adv. Drug Res.* 14: 1–40.
72. Franklin, T.J., and Snow, G.A. (1989). *Biochemistry of antimicrobial action*. 4th ed. Chapman and Hall, London.
73. Frey, J., Ghersa, P., Palacios, P. G., and Belet, M. (1986). Physical and genetic analysis of the ColD plasmid. *Journal of bacteriology*, 166(1), 15–19.
74. Fu, D., Calvo, J. A., & Samson, L. D. (2012). Balancing repair and tolerance of DNA damage caused by alkylating agents. *Nature reviews. Cancer*, 12(2), 104–120. <https://doi.org/10.1038/nrc3185>
75. Galkin, V. E., Britt, R. L., Bane, L. B., Yu, X., Cox, M. M., and Egelman, E. H. (2011). Two modes of binding of DinI to RecA filament provide a new insight into the regulation of SOS response by DinI protein. *Journal of molecular biology*, 408(5), 815–824.
76. Garay, R. P., and Grossberg, G. T. (2017). AVP-786 for the treatment of agitation in dementia of the Alzheimer's type. *Expert opinion on investigational drugs*, 26(1), 121–132.
77. Gerson S. L. (2004). MGMT: its role in cancer aetiology and cancer therapeutics. *Nature reviews. Cancer*, 4(4), 296–307.
78. Goldmacher, V. S., Cuzick, R. A., Jr, & Thilly, W. G. (1986). Isolation and partial characterization of human cell mutants differing in sensitivity to killing and mutation by methylnitrosourea and N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine. *The Journal of biological chemistry*, 261(27), 12462–12471.
79. Goodman, M. F., McDonald, J. P., Jaszczur, M. M., and Woodgate, R. (2016). Insights into the complex levels of regulation imposed on *Escherichia coli* DNA polymerase V. *DNA repair*, 44, 42–50.
80. Gruenig, M. C., Renzette, N., Long, E., Chitteni-Pattu, S., Inman, R. B., Cox, M. M., and Sandler, S. J. (2008). RecA-mediated SOS induction

- requires an extended filament conformation but no ATP hydrolysis. *Molecular microbiology*, 69(5), 1165–1179.
81. Guengerich, F. P. (2008). Cytochrome p450 and chemical toxicology. *Chemical research in toxicology*, 21(1), 70–83.
82. Gyöngyi, Z., and Somlyai, G. (2000). Deuterium depletion can decrease the expression of C-myc Ha-ras and p53 gene in carcinogen-treated mice. *In vivo (Athens, Greece)*, 14(3), 437–439.
83. Gyöngyi, Z., Budán, F., Szabó, I., Ember, I., Kiss, I., Krempels, K., Somlyai, I., and Somlyai, G. (2013). Deuterium depleted water effects on survival of lung cancer patients and expression of Kras, Bcl2, and Myc genes in mouse lung. *Nutrition and cancer*, 65(2), 240–246.
84. Haon, S., Augé, S., Tropis, M., Milon, A., and Lindley, N. D. (1993). Low cost production of perdeuterated biomass using methylotrophic yeasts. *Journal of labelled compounds and radiopharmaceuticals*, 33(11), 1053-1063.
85. Hatanaka, H. (1989). Clinical results of neutron capture therapy. In *Neutron beam design, development, and performance for neutron capture therapy*. Basic life sciences. Vol. 54. Edited by O.K. Harling, J.A. Bernard, and R.G. Zamenhof. Pergamon Press, New York. 15–21.
86. Hatanaka, H. (1991). Boron-neutron capture therapy for tumors. In *Glioma* (pp. 233-249). Springer, Berlin, Heidelberg.
87. Heitzer, A., Malachowsky, K., Thonnard, J. E., Bienkowski, P. R., White, D. C., and Saylor, G. S. (1994). Optical biosensor for environmental on-line monitoring of naphthalene and salicylate bioavailability with an immobilized bioluminescent catabolic reporter bacterium. *Applied and environmental microbiology*, 60(5), 1487–1494.
88. Henrikus, S. S., van Oijen, A. M., and Robinson, A. (2018). Specialised DNA polymerases in *Escherichia coli*: roles within multiple pathways. *Current genetics*, 64(6), 1189–1196.

- 89.Herschman, H. R., and Helinski, D. R. (1967). Comparative study of the events associated with colicin induction. *Journal of bacteriology*, 94(3), 691–699.
- 90.Hinz, H.R., Harris, N.J., Giovanella, B.C., Ezell, E.L., and Liehr, J.G. (1996). Stabilities of 3H- and 2H-labelled camptothecins. *J. Labelled Compd. Radiopharm.* 38: 733–742.
- 91.Hohlefeldler, L. S., Stögbauer, T., Opitz, M., Bayerl, T. M., and Rädler, J. O. (2013). Heavy water reduces GFP expression in prokaryotic cell-free assays at the translation level while stimulating its transcription. *BioMed research international*, 2013, 592745.
- 92.Hooper, D. C., & Wolfson, J. S. (1985). The fluoroquinolones: pharmacology, clinical uses, and toxicities in humans. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 28(5), 716–721. <https://doi.org/10.1128/AAC.28.5.716>
- 93.Horii, T., Ogawa, T., and Ogawa, H. (1980). Organization of the *recA* gene of *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 77(1), 313–317.
- 94.Hu, X., Li, H., Ding, J., Han, S., & ab Initio Study (2004). Mutagenic mechanism of the A-T to G-C transition induced by 5-bromouracil: an ab Initio Study. *Biochemistry*, 43(21), 6361–6369. <https://doi.org/10.1021/bi049859+>
- 95.Ikenaga, M., Ishii, Y., Tada, M., Kakunaga, T., & Takebe, H. (1975). Excision-repair of 4-nitroquinolin-1-oxide damage responsible for killing, mutation, and cancer. *Basic life sciences*, 5B, 763–771. [https://doi.org/10.1007/978-1-4684-2898-8\\_54](https://doi.org/10.1007/978-1-4684-2898-8_54)
- 96.Inouye, M. (1971). Pleiotropic effect of the *rec A* gene of *Escherichia coli*: uncoupling of cell division from deoxyribonucleic acid replication. *Journal of bacteriology*, 106(2), 539–542.

97. Inouye, S. (1994). NAD(P)H-flavin oxidoreductase from the bioluminescent bacterium, *Vibrio fischeri* ATCC 7744, is a flavoprotein. *FEBS letters*, 347(2-3), 163–168.
98. Ipte, P. R., & Satpati, A. K. (2020). Probing the interaction of ciprofloxacin and *E. coli* by electrochemistry, spectroscopy and atomic force microscopy. *Biophysical chemistry*, 266, 106456. <https://doi.org/10.1016/j.bpc.2020.106456>
99. Itoh, T. J., and Sato, H. (1984). The effects of deuterium oxide ( $2\text{H}_2\text{O}$ ) on the polymerization of tubulin in vitro. *Biochimica et biophysica acta*, 800(1), 21–27.
100. James, R., Kleanthous, C., and Moore, G. R. (1996). The biology of *E. coli* colicins: paradigms and paradoxes. *Microbiology (Reading, England)*, 142 ( Pt 7), 1569–1580.
101. Janion, C. (2008). Inducible SOS response system of DNA repair and mutagenesis in *Escherichia coli*. *International journal of biological sciences*, 4(6), 338–344.
102. Jaszczur, M., Bertram, J. G., Robinson, A., van Oijen, A. M., Woodgate, R., Cox, M. M., and Goodman, M. F. (2016). Mutations for Worse or Better: Low-Fidelity DNA Synthesis by SOS DNA Polymerase V Is a Tightly Regulated Double-Edged Sword. *Biochemistry*, 55(16), 2309–2318.
103. Jeggo, P., Defais, T. M., Samson, L., and Schendel, P. (1977). An adaptive response of *E. coli* to low levels of alkylating agent: comparison with previously characterised DNA repair pathways. *Molecular & general genetics : MGG*, 157(1), 1–9.
104. Julsing, J. R., and Peters, G. J. (2014). Methylation of DNA repair genes and the efficacy of DNA targeted anticancer treatment. *Oncol. Discov*, 2(3).
105. Karu, A. E., and Belk, E. D. (1982). Induction of *E. coli* recA protein via recBC and alternate pathways: quantitation by enzyme-linked

- immunosorbent assay (ELISA). *Molecular & general genetics* : MGG, 185(2), 275–282.
106. Katz, J. J. (1960). The biology of heavy water. What happens to experimental organisms that have been raised on water in which the hydrogen is not the common isotope of mass one but the heavy isotope of mass two?. *Scientific American*, 203, 106–116.
107. Keller, K. L., Overbeck-Carrick, T. L., & Beck, D. J. (2001). Survival and induction of SOS in *Escherichia coli* treated with cisplatin, UV-irradiation, or mitomycin C are dependent on the function of the RecBC and RecFOR pathways of homologous recombination. *Mutation research*, 486(1), 21–29. [https://doi.org/10.1016/s0921-8777\(01\)00077-5](https://doi.org/10.1016/s0921-8777(01)00077-5)
108. Kleanthous, C., Hemmings, A. M., Moore, G. R., and James, R. (1998). Immunity proteins and their specificity for endonuclease colicins: telling right from wrong in protein–protein recognition. *Molecular microbiology*, 28(2), 227-233.
109. Klein, A. R., Fernández, V. M., and Thauer, R. K. (1995). H<sup>2</sup>-forming N<sup>5</sup>, N<sup>10</sup>-methylene tetrahydromethanopterin dehydrogenase: mechanism of H<sup>2</sup> formation analyzed using hydrogen isotopes. *FEBS letters*, 368(2), 203-206.
110. Kowalczykowski, S. C., Dixon, D. A., Eggleston, A. K., Lauder, S. D., and Rehrauer, W. M. (1994). Biochemistry of homologous recombination in *Escherichia coli*. *Microbiological reviews*, 58(3), 401–465.
111. Kowalczykowski, S. C., Dixon, D. A., Eggleston, A. K., Lauder, S. D., and Rehrauer, W. M. (1994). Biochemistry of homologous recombination in *Escherichia coli*. *Microbiological reviews*, 58(3), 401–465.
112. Krescheck, G. C., Schneider, H., and Scheraga, H. A. (1965). The effect of D<sub>2</sub>O on the thermal stability of proteins. *Thermodynamic*

parameters for the transfer of model compounds from H<sub>2</sub>O to D<sub>2</sub>O. *The Journal of physical chemistry*, 69(9), 3132–3144.

113. Kushner, D.J. (1998). What is halophilic and what is archaeal? *Proceedings of Workshop on Biology and Geochemistry of Hypersaline Environments*, Jerusalem, Israel, June 22–26, 1997. CRC Press, Boca Raton, Fla. pp. 215–225.
114. Kuzminov, A. (1999). Recombinational repair of DNA damage in *Escherichia coli* and bacteriophage lambda. *Microbiology and molecular biology reviews: MMBR*, 63(4), 751–813.
115. Laissue, J. A., Altermatt, H. J., Bally, E., and Gebbers, J. O. (1987). Protection of mice from whole body gamma irradiation by deuteration of drinking water: hematologic findings. *Experimental hematology*, 15(2), 177–180.
116. Laissue, J. A., Bürki, H., and Berchtold, W. (1982). Survival of tumor-bearing mice exposed to heavy water or heavy water plus methotrexate. *Cancer research*, 42(3), 1125–1129.
117. Lamprecht, J., Schroeter, D., and Paweletz, N. (1991). Derangement of microtubule arrays in interphase and mitotic PtK2 cells treated with deuterium oxide (heavy water). *Journal of cell science*, 98 (Pt 4), 463–473.
118. Landini, P., and Busby, S. J. (1999). The *Escherichia coli* Ada protein can interact with two distinct determinants in the sigma70 subunit of RNA polymerase according to promoter architecture: identification of the target of Ada activation at the *alkA* promoter. *Journal of bacteriology*, 181(5), 1524–1529.
119. Landini, P., and Volkert, M. R. (1995). Transcriptional activation of the *Escherichia coli* adaptive response gene *aidB* is mediated by binding of methylated Ada protein. Evidence for a new consensus sequence for Ada-binding sites. *The Journal of biological chemistry*, 270(14), 8285–8289.

120. Landini, P., and Volkert, M. R. (2000). Regulatory responses of the adaptive response to alkylation damage: a simple regulon with complex regulatory features. *Journal of bacteriology*, 182(23), 6543–6549.
121. Landini, P., Bown, J. A., Volkert, M. R., and Busby, S. J. (1998). Ada protein-RNA polymerase sigma subunit interaction and alpha subunit-promoter DNA interaction are necessary at different steps in transcription initiation at the *Escherichia coli* Ada and aidB promoters. *The Journal of biological chemistry*, 273(21), 13307–13312.
122. Landini, P., Hajec, L. I., and Volkert, M. R. (1994). Structure and transcriptional regulation of the *Escherichia coli* adaptive response gene aidB. *Journal of bacteriology*, 176(21), 6583–6589.
123. Lawley, P. D., Orr, D. J., Shah, S. A., Farmer, P. B., & Jarman, M. (1973). Reaction products from N-methyl-N-nitrosourea and deoxyribonucleic acid containing thymidine residues. Synthesis and identification of a new methylation product, O4-methylthymidine. *The Biochemical journal*, 135(1), 193–201. <https://doi.org/10.1042/bj1350193>
124. Lazdunski, C. J., Bouveret, E., Rigal, A., Journet, L., Llobès, R., and Bénédicti, H. (1998). Colicin import into *Escherichia coli* cells. *Journal of bacteriology*, 180(19), 4993–5002.
125. Lee, J. H., Mitchell, R. J., Kim, B. C., Cullen, D. C., and Gu, M. B. (2005). A cell array biosensor for environmental toxicity analysis. *Biosensors & bioelectronics*, 21(3), 500–507.
126. Lewis, L. K., Harlow, G. R., Gregg-Jolly, L. A., and Mount, D. W. (1994). Identification of high affinity binding sites for LexA which define new DNA damage-inducible genes in *Escherichia coli*. *Journal of molecular biology*, 241(4), 507–523.
127. Li, D., Delaney, J. C., Page, C. M., Chen, A. S., Wong, C., Drennan, C. L., and Essigmann, J. M. (2010). Repair of DNA alkylation damage by the *Escherichia coli* adaptive response protein AlkB as studied by ESI-TOF mass spectrometry. *Journal of nucleic acids*, 2010.

128. Liepins, A. (1993). U.S. Patent No. 5,223,269. Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office.
129. Lijinsky W. (1976). Interaction with nucleic acids of carcinogenic and mutagenic N-nitroso compounds. *Progress in nucleic acid research and molecular biology*, 17, 247–269. [https://doi.org/10.1016/s0079-6603\(08\)60072-0](https://doi.org/10.1016/s0079-6603(08)60072-0)
130. Lindahl, T., Sedgwick, B., Sekiguchi, M., and Nakabeppu, Y. (1988). Regulation and expression of the adaptive response to alkylating agents. *Annual review of biochemistry*, 57, 133–157.
131. Little, J. W. (1991). Mechanism of specific LexA cleavage: autodigestion and the role of RecA coprotease. *Biochimie*, 73(4), 411–421.
132. Little, J. W., and Mount, D. W. (1982). The SOS regulatory system of *Escherichia coli*. *Cell*, 29(1), 11–22.
133. Loechler, E. L., Green, C. L., & Essigmann, J. M. (1984). In vivo mutagenesis by O6-methylguanine built into a unique site in a viral genome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 81(20), 6271–6275. <https://doi.org/10.1073/pnas.81.20.6271>
134. Loveless A. (1969). Possible relevance of O-6 alkylation of deoxyguanosine to the mutagenicity and carcinogenicity of nitrosamines and nitrosamides. *Nature*, 223(5202), 206–207. <https://doi.org/10.1038/223206a0>
135. Luo, Y., Pfuetzner, R. A., Mosimann, S., Paetzel, M., Frey, E. A., Cherney, M., Kim, B., Little, J. W., and Strynadka, N. C. (2001). Crystal structure of LexA: a conformational switch for regulation of self-cleavage. *Cell*, 106(5), 585–594.
136. Lusetti, S. L., Drees, J. C., Stohl, E. A., Seifert, H. S., and Cox, M. M. (2004). The DinI and RecX proteins are competing modulators of RecA function. *The Journal of biological chemistry*, 279(53), 55073–55079.

137. Lusetti, S. L., Voloshin, O. N., Inman, R. B., Camerini-Otero, R. D., and Cox, M. M. (2004). The DinI protein stabilizes RecA protein filaments. *The Journal of biological chemistry*, 279(29), 30037–30046.
138. Ma, X. Y., Wang, X. C., Ngo, H. H., Guo, W., Wu, M. N., and Wang, N. (2014). Bioassay based luminescent bacteria: interferences, improvements, and applications. *The Science of the total environment*, 468-469, 1–11.
139. Mabic, S., and Castagnoli Jr, N. (1996). Regioselective synthesis of deuterated analogs of the neurotoxin MPTP. *Journal of Labelled Compounds and Radiopharmaceuticals*, 38(3), 255-262.
140. Magee P, Montesano R, Preussman R. *N-Nitroso compounds and related carcinogenesis*. Washington: ACS Press; 1976
141. Majeed, H., Gillor, O., Kerr, B., and Riley, M. A. (2011). Competitive interactions in *Escherichia coli* populations: the role of bacteriocins. *The ISME journal*, 5(1), 71–81.
142. Margison G, O'Connor P. Nucleic acid modification by N-nitroso compounds. In: Grover P, editor. *Chemical carcinogens and DNA*. Florida: CRC Press; 1979. p. 111–59.
143. Marsland, D., Tilney, L. G., and Hirshfield, M. (1971). Stabilizing effects of D<sub>2</sub>O on the microtubular components and needle-like form of heliozoan axopods: a pressure-temperature analysis. *Journal of cellular physiology*, 77(2), 187–194.
144. Masaki, H., and Ohta, T. (1985). Colicin E3 and its immunity genes. *Journal of molecular biology*, 182(2), 217–227.
145. Matheson, I. B., and Lee, J. (1981). An efficient bacterial bioluminescence with reduced lumichrome. *Biochemical and biophysical research communications*, 100(2), 532–536.
146. McCann, J., Choi, E., Yamasaki, E., and Ames, B. N. (1975). Detection of carcinogens as mutagens in the *Salmonella*/microsome test:

assay of 300 chemicals. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 72(12), 5135–5139.

147. McCarty, L. P., Malek, R. S., and Larsen, E. R. (1979). The effects of deuteration on the metabolism of halogenated anesthetics in the rat. *Anesthesiology*, 51(2), 106–110.
148. McEntee, K., Hesse, J. E., and Epstein, W. (1976). Identification and radiochemical purification of the recA protein of *Escherichia coli* K-12. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 73(11), 3979–3983.
149. McPartland, A., Green, L., & Echols, H. (1980). Control of recA gene RNA in *E. coli*: regulatory and signal genes. *Cell*, 20(3), 731–737. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(80\)90319-0](https://doi.org/10.1016/0092-8674(80)90319-0)
150. Meighen, E. A. (1991). Molecular biology of bacterial bioluminescence. *Microbiological reviews*, 55(1), 123–142.
151. Merck and Co., Inc. (1977). US Patent 4028405.
152. Michel, B. (2005). After 30 years of study, the bacterial SOS response still surprises us. *PLoS biology*, 3(7), e255.
153. Mielecki, D., and Grzesiuk, E. (2014). Ada response - a strategy for repair of alkylated DNA in bacteria. *FEMS microbiology letters*, 355(1), 1–11.
154. Mielecki, D., Wrzesiński, M., and Grzesiuk, E. (2015). Inducible repair of alkylated DNA in microorganisms. *Mutation research. Reviews in mutation research*, 763, 294–305.
155. Ming, X., Michaelson-Richie, E. D., Groehler, A. S., 4th, Villalta, P. W., Campbell, C., & Tretyakova, N. Y. (2020). Cross-linking of the DNA repair protein O6-alkylguanine DNA alkyltransferase to DNA in the presence of cisplatin. *DNA repair*, 89, 102840. <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2020.102840>
156. Mosberg, H. I., Omnaas, J. R., Ramalingam, K., and Woodard, R. W. (1987). Synthesis of deuterium labelled penicillamine and its use for the

- assignment of the  $^1\text{H}$  NMR spectra of two cyclic enkephalin analogs. *Journal of Labelled Compounds and Radiopharmaceuticals*, 24(10), 1265-1271.
157. Mullard A. (2017). FDA approves dupilumab for severe eczema. *Nature reviews. Drug discovery*, 16(5), 305.
158. Myers, R. S., & Stahl, F. W. (1994). Chi and the RecBC D enzyme of *Escherichia coli*. *Annual review of genetics*, 28, 49–70. <https://doi.org/10.1146/annurev.ge.28.120194.000405>
159. Nakabeppu, Y., and Sekiguchi, M. (1986). Regulatory mechanisms for induction of synthesis of repair enzymes in response to alkylating agents: ada protein acts as a transcriptional regulator. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 83(17), 6297–6301.
160. Neher, S. B., Flynn, J. M., Sauer, R. T., and Baker, T. A. (2003). Latent ClpX-recognition signals ensure LexA destruction after DNA damage. *Genes & development*, 17(9), 1084–1089.
161. Nelson, S.D. (1983). The use of stable and radioactive isotopes in monitoring reactive metabolite formation. In *Synthesis and applications of isotopically labeled compounds. Proceedings of an international symposium*. Edited by W.P. Duncan and A.B. Susan. Kansas City, Mo., June 6–11, 1982. Elsevier, Amsterdam. pp. 89–94.
162. Nona, D. A., Blake, M. I., Crespi, H. L., and Katz, J. J. (1968). Effect of deuterium oxide on the culturing of *Penicillium janczewskii*. 3. Antifungal activity of fully deuterated griseofulvin. *Journal of pharmaceutical sciences*, 57(11), 1993–1995.
163. Norman, A., Hansen, L. H., and Sorensen, S. J. (2005). Construction of a ColD cda promoter-based SOS-green fluorescent protein whole-cell biosensor with higher sensitivity toward genotoxic compounds than constructs based on recA, umuDC, or sulA promoters. *Applied and environmental microbiology*, 71(5), 2338-2346.

164. Northrop, D. B. (1982). Deuterium and tritium kinetic isotope effects on initial rates. *Methods in enzymology*, 87, 607–625.
165. Ogawa, T., Tomita, K., Ueda, T., Watanabe, K., Uozumi, T., and Masaki, H. (1999). A cytotoxic ribonuclease targeting specific transfer RNA anticodons. *Science (New York, N.Y.)*, 283(5410), 2097–2100.
166. Palom, Y., Suresh Kumar, G., Tang, L. Q., Paz, M. M., Musser, S. M., Rockwell, S., & Tomasz, M. (2002). Relative toxicities of DNA cross-links and monoadducts: new insights from studies of decarbamoyl mitomycin C and mitomycin C. *Chemical research in toxicology*, 15(11), 1398–1406. <https://doi.org/10.1021/tx020044g>
167. Parker, J. B., & Stivers, J. T. (2011). Dynamics of uracil and 5-fluorouracil in DNA. *Biochemistry*, 50(5), 612–617. <https://doi.org/10.1021/bi101536k>
168. Patel, M., Jiang, Q., Woodgate, R., Cox, M. M., and Goodman, M. F. (2010). A new model for SOS-induced mutagenesis: how RecA protein activates DNA polymerase V. *Critical reviews in biochemistry and molecular biology*, 45(3), 171–184.
169. Paterson, Y., Englander, S. W., and Roder, H. (1990). An antibody binding site on cytochrome c defined by hydrogen exchange and two-dimensional NMR. *Science (New York, N.Y.)*, 249(4970), 755–759.
170. Pegg, A. E., Dolan, M. E., & Moschel, R. C. (1995). Structure, function, and inhibition of O6-alkylguanine-DNA alkyltransferase. *Progress in nucleic acid research and molecular biology*, 51, 167–223. [https://doi.org/10.1016/s0079-6603\(08\)60879-x](https://doi.org/10.1016/s0079-6603(08)60879-x)
171. Persing, D. H., McGinty, L., Adams, C. W., & Fowler, R. G. (1981). Mutational specificity of the base analogue, 2-aminopurine, in *Escherichia coli*. *Mutation research*, 83(1), 25–37. [https://doi.org/10.1016/0027-5107\(81\)90068-3](https://doi.org/10.1016/0027-5107(81)90068-3)
172. Pohlhaus, J. R., & Kreuzer, K. N. (2005). Norfloxacin-induced DNA gyrase cleavage complexes block *Escherichia coli* replication forks,

- causing double-stranded breaks in vivo. *Molecular microbiology*, 56(6), 1416–1429. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2005.04638.x>
173. Pohlhaus, J. R., Long, D. T., O'Reilly, E., & Kreuzer, K. N. (2008). The epsilon subunit of DNA polymerase III Is involved in the nalidixic acid-induced SOS response in *Escherichia coli*. *Journal of bacteriology*, 190(15), 5239–5247. <https://doi.org/10.1128/JB.00173-08>
174. Prod'hom, B., Pietrobon, D., and Hess, P. (1987). Direct measurement of proton transfer rates to a group controlling the dihydropyridine-sensitive Ca<sup>2+</sup> channel. *Nature*, 329(6136), 243–246.
175. Pugsley, A. P. (1984). The ins and outs of colicins. Part I: Production, and translocation across membranes. *Microbiological sciences*, 1(7), 168–175.
176. Quillardet, P., Rouffaud, M. A., and Bouige, P. (2003). DNA array analysis of gene expression in response to UV irradiation in *Escherichia coli*. *Research in microbiology*, 154(8), 559–572.
177. Radman, M. (1974). Phenomenology of a inducible mutagenic DNA repair pathway in *Escherichia coli*: SOS repair hypothesis. *Molecular and environmental aspects of mutagenesis*. Springfield IL: Charles C Thomsa publisher. P. 128–142.
178. Rangarajan, S., Woodgate, R., and Goodman, M. F. (1999). A phenotype for enigmatic DNA polymerase II: a pivotal role for pol II in replication restart in UV-irradiated *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(16), 9224–9229.
179. Rasooli, A., Fatemi, F., Hajihosseini, R., Vaziri, A., Akbarzadeh, K., Mohammadi Malayeri, M. R., Dini, S., and Foroutanrad, M. (2019). Synergistic effects of deuterium depleted water and *Mentha longifolia* L. essential oils on sepsis-induced liver injuries through regulation of cyclooxygenase-2. *Pharmaceutical biology*, 57(1), 125–132.

180. Ratcliffe, N. T. & Smith, J. T. (1984). Ciprofloxacin and ofloxacin exhibit a rifampicin-resistant bactericidal mechanism not detectable in other 4-quinolone antibacterial agents. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 36, 59P.
181. Reuter, H. D., Fischer, J. H., and Thiele, S. (1985). Investigations on the effects of heavy water (D<sub>2</sub>O) on the functional activity of human platelets. *Haemostasis*, 15(3), 157–163.
182. Roca, A. I., and Cox, M. M. (1997). RecA protein: structure, function, and role in recombinational DNA repair. *Progress in nucleic acid research and molecular biology*, 56, 129–223.
183. Rodewald, L. E., Maiman, L. A., Foye, H. R., Borch, R. F., and Forbes, G. B. (1989). Deuterium oxide as a tracer for measurement of compliance in pediatric clinical drug trials. *The Journal of pediatrics*, 114(5), 885–891.
184. Rodgers, M. A., and Snowden, P. T. (1982). Lifetime of oxygen (O<sub>2</sub> (1. DELTA.g)) in liquid water as determined by time-resolved infrared luminescence measurements. *Journal of the American Chemical Society*, 104(20), 5541-5543.
185. Rohankhedkar, M. S., Mulrooney, S. B., Wedemeyer, W. J., and Hausinger, R. P. (2006). The AidB component of the *Escherichia coli* adaptive response to alkylating agents is a flavin-containing, DNA-binding protein. *Journal of bacteriology*, 188(1), 223–230.
186. Roos, U., Harkness, R. E., and Braun, V. (1989). Assembly of colicin genes from a few DNA fragments. Nucleotide sequence of colicin D. *Molecular microbiology*, 3(7), 891–902.
187. Sabharwal, A., and Middleton, M. R. (2006). Exploiting the role of O<sup>6</sup>-methylguanine-DNA-methyltransferase (MGMT) in cancer therapy. *Current opinion in pharmacology*, 6(4), 355–363.
188. Sabounjian, L., Graham, P., Wu, L., Braman, V., Cheng, C., Liu, J., Shipley, J., Neutel, J., and Dao, M. (2016). A First-in-Patient,

Multicenter, Double-Blind, 2-Arm, Placebo-Controlled, Randomized Safety and Tolerability Study of a Novel Oral Drug Candidate, CTP-499, in Chronic Kidney Disease. *Clinical pharmacology in drug development*, 5(4), 314–325.

189. Saget, B. M., and Walker, G. C. (1994). The Ada protein acts as both a positive and a negative modulator of *Escherichia coli*'s response to methylating agents. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91(21), 9730–9734.
190. Sakumi, K., Igarashi, K., Sekiguchi, M., and Ishihama, A. (1993). The Ada protein is a class I transcription factor of *Escherichia coli*. *Journal of bacteriology*, 175(8), 2455–2457.
191. Salles, B., Weisemann, J. M., and Weinstock, G. M. (1987). Temporal control of colicin E1 induction. *Journal of bacteriology*, 169(11), 5028–5034.
192. Samson, L., and Cairns, J. (1977). A new pathway for DNA repair in *Escherichia coli*. *Nature*, 267(5608), 281–283.
193. Sassanfar, M., and Roberts, J. W. (1990). Nature of the SOS-inducing signal in *Escherichia coli*. The involvement of DNA replication. *Journal of molecular biology*, 212(1), 79–96.
194. Sedgwick, B., Bates, P. A., Paik, J., Jacobs, S. C., and Lindahl, T. (2007). Repair of alkylated DNA: recent advances. *DNA repair*, 6(4), 429–442.
195. Sestili, P., Brigotti, M., Calcabrini, C., Turrini, E., Arfilli, V., Carnicelli, D., Lucarini, M., Mazzanti, A., Milelli, A., Righi, V., and Fimognari, C. (2019). Deuterium Incorporation Protects Cells from Oxidative Damage. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2019, 6528106.
196. Shrivastav, N., Li, D., & Essigmann, J. M. (2010). Chemical biology of mutagenesis and DNA repair: cellular responses to DNA alkylation. *Carcinogenesis*, 31(1), 59–70. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgp262>

197. Singer, B., & Kuśmierk, J. T. (1982). Chemical mutagenesis. Annual review of biochemistry, 51, 655–693. <https://doi.org/10.1146/annurev.bi.51.070182.003255>
198. Sinha, R. P., & Häder, D. P. (2002). UV-induced DNA damage and repair: a review. Photochemical & photobiological sciences : Official journal of the European Photochemistry Association and the European Society for Photobiology, 1(4), 225–236. <https://doi.org/10.1039/b201230h>
199. Smith, J. T. (1984). Awakening the slumbering potential of the 4-quinolone antibiotics. *Pharmaceutical Journal* 233, 299-305.
200. Sollott, S. J., Cheng, L., Pauly, R. R., Jenkins, G. M., Monticone, R. E., Kuzuya, M., Froehlich, J. P., Crow, M. T., Lakatta, E. G., and Rowinsky, E. K. (1995). Taxol inhibits neointimal smooth muscle cell accumulation after angioplasty in the rat. *The Journal of clinical investigation*, 95(4), 1869–1876.
201. Song, Y., Li, G., Thornton, S. F., Thompson, I. P., Banwart, S. A., Lerner, D. N., and Huang, W. E. (2009). Optimization of bacterial whole cell bioreporters for toxicity assay of environmental samples. *Environmental science & technology*, 43(20), 7931–7938.
202. Stojic, L., Mojas, N., Cejka, P., Di Pietro, M., Ferrari, S., Marra, G., & Jiricny, J. (2004). Mismatch repair-dependent G2 checkpoint induced by low doses of SN1 type methylating agents requires the ATR kinase. *Genes & development*, 18(11), 1331–1344. <https://doi.org/10.1101/gad.294404>
203. Story, R. M., and Steitz, T. A. (1992). Structure of the recA protein-ADP complex. *Nature*, 355(6358), 374–376.
204. Story, R. M., Weber, I. T., and Steitz, T. A. (1992). The structure of the E. coli recA protein monomer and polymer. *Nature*, 355(6358), 318–325.

205. Tang, M., Shen, X., Frank, E. G., O'Donnell, M., Woodgate, R., and Goodman, M. F. (1999). UmuD'(2)C is an error-prone DNA polymerase, *Escherichia coli* pol V. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(16), 8919–8924.
206. Thomas, A.F. (1971). *Deuterium labeling in organic chemistry*. Appleton-Century Crofts, New York.
207. Thomson, John F. *Biological Effects of Deuterium*. New York: Macmillan, 1963. Print.
208. Timmins, G. S. (2014). Deuterated drugs: where are we now?. *Expert opinion on therapeutic patents*, 24(10), 1067–1075.
209. Tippin, B., Pham, P., & Goodman, M. F. (2004). Error-prone replication for better or worse. *Trends in microbiology*, 12(6), 288–295.
210. Tomita, K., Ogawa, T., Uozumi, T., Watanabe, K., and Masaki, H. (2000). A cytotoxic ribonuclease which specifically cleaves four isoaccepting arginine tRNAs at their anticodon loops. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(15), 8278-8283.
211. Tsuzuki, H., Harada, T., Mukumoto, M., Mataka, S., Tsukinoki, T., Kakinami, T., Nagano, Y., and Tashiro, M. (1996). Ultrasoundassisted reduction of cyanides to deuterated aliphatic amines. *J. Labelled Compd. Radiopharm.* 38: 385–394.
212. Tung, R. D. (2016). Deuterium medicinal chemistry comes of age. *Future medicinal chemistry*, 8(5), 491–494.
213. Unno, K., and Okada, S. (1994). Deuteration causes the decreased induction of heat-shock proteins and increased sensitivity to heat denaturation of proteins in *Chlorella*. *Plant and cell physiology*, 35(2), 197-202.
214. Unno, K., Shimba, S., and Okada, S. (1989). Modification of thermal response of *Chlorella ellipsoidea* by deuteration. *Chemical and pharmaceutical bulletin*, 37(11), 3047-3049.

215. Urbanczyk, H., Ast, J. C., Higgins, M. J., Carson, J., and Dunlap, P. V. (2007). Reclassification of *Vibrio fischeri*, *Vibrio logei*, *Vibrio salmonicida* and *Vibrio wodanis* as *Aliivibrio fischeri* gen. nov., comb. nov., *Aliivibrio logei* comb. nov., *Aliivibrio salmonicida* comb. nov. and *Aliivibrio wodanis* comb. nov. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 57(Pt 12), 2823–2829.
216. Urey, H.C., Brickwedde, F.G., and Murphy, G.M. (1932). A hydrogen isotope of mass 2. *Physical review*, 39(1), 164-165.
217. Utsumi, H., and Elkind, M. M. (1991). Caffeine and D2O medium interact in affecting the expression of radiation-induced potentially lethal damage. *International journal of radiation biology*, 60(4), 647–655.
218. Van Dyk, T. K., Majarian, W. R., Konstantinov, K. B., Young, R. M., Dhurjati, P. S., and LaRossa, R. A. (1994). Rapid and sensitive pollutant detection by induction of heat shock gene-bioluminescence gene fusions. *Applied and environmental microbiology*, 60(5), 1414–1420.
219. Vanatalu, K., Paalme, T., Vilu, R., Burkhardt, N., Jünemann, R., May, R., Rühl, M., Wadzack, J., and Nierhaus, K. H. (1993). Large-scale preparation of fully deuterated cell components. Ribosomes from *Escherichia coli* with high biological activity. *European journal of biochemistry*, 216(1), 315–321.
220. Vasdev, S., Gupta, I. P., Sampson, C. A., Longerich, L., and Parai, S. (1993). Deuterium oxide normalizes blood pressure and elevated cytosolic calcium in rats with ethanol-induced hypertension. *The Canadian Journal of Cardiology*, 9(9), 802-808.
221. Vasdev, S., Prabhakaran, V. M., Whelan, M., Ford, C. A., Longerich, L., and Parai, S. (1994). Fructose-induced hypertension, hypertriglyceridemia and elevated cytosolic calcium in rats: prevention by deuterium oxide. *Artery*, 21(3), 124-147.

222. Vasilescu, V., and Katona, E. (1986). Deuteration as a tool in investigating the role of water in the structure and function of excitable membranes. *Methods in enzymology*, 127, 662–678.
223. Verschaeve, L., Van Gompel, J., Thilemans, L., Regniers, L., Vanparys, P., and van der Lelie, D. (1999). VITOTOX bacterial genotoxicity and toxicity test for the rapid screening of chemicals. *Environmental and molecular mutagenesis*, 33(3), 240–248.
224. Vogel, H.G., Hock, F. J., Maas, J., Mayer, D. *Drug Discovery and Evaluation Safety and Pharmacokinetic Assays*, Springer, Berlin, 2006, 151–193.
225. Volkert M. R. (1988). Adaptive response of *Escherichia coli* to alkylation damage. *Environmental and molecular mutagenesis*, 11(2), 241–255.
226. Vollmer, A. C., Belkin, S., Smulski, D. R., Van Dyk, T. K., and LaRossa, R. A. (1997). Detection of DNA damage by use of *Escherichia coli* carrying *recA'::lux*, *uvrA'::lux*, or *alkA'::lux* reporter plasmids. *Applied and environmental microbiology*, 63(7), 2566–2571.
227. Voloshin, O. N., Ramirez, B. E., Bax, A., and Camerini-Otero, R. D. (2001). A model for the abrogation of the SOS response by an SOS protein: a negatively charged helix in DinI mimics DNA in its interaction with RecA. *Genes & development*, 15(4), 415–427.
228. Walker, G. C. (1984). Mutagenesis and inducible responses to deoxyribonucleic acid damage in *Escherichia coli*. *Microbiological reviews*, 48(1), 60–93.
229. Wallace, S. A., Mathur, J. N., and Allen, B. J. (1995). The influence of heavy water on boron requirements for neutron capture therapy. *Medical physics*, 22(5), 585–590.
230. Webb, P., and Threadgill, M.D. (1990). Labelled compounds of interest as antitumour agents. Part II (1). Synthesis of 2H and 3H

- isotopomers of RSU 1069 and Ro 03-8799 (Pimonidazole). *J. Labelled Compd. Radiopharm.* 28: 257–264.
231. Wenzel, M. (1989). Erhöhte gehirn-affinität von <sup>131</sup>J-markierten n-(alkyl)-amphetaminen nach deuterierung. *Journal of Labelled Compounds and Radiopharmaceuticals*, 27(10), 1143-1155.
232. Wolfson, J. S., & Hooper, D. C. (1985). The fluoroquinolones: structures, mechanisms of action and resistance, and spectra of activity in vitro. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 28(4), 581–586. <https://doi.org/10.1128/AAC.28.4.581>
233. Wyatt, M. D., & Wilson, D. M., 3rd (2009). Participation of DNA repair in the response to 5-fluorouracil. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*, 66(5), 788–799. <https://doi.org/10.1007/s00018-008-8557-5>
234. Yang, S.K., Tang, R., and Pu, Q.-L. (1996). Synthesis of 3deuterated diazepam and nordiazepam and their use in synthesis of other 3-deuterated derivatives. *J. Labelled Compd. Radiopharm.* 38: 753–760.
235. Yasuda, T., Morimatsu, K., Horii, T., Nagata, T., and Ohmori, H. (1998). Inhibition of Escherichia coli RecA coprotease activities by DinI. *The EMBO journal*, 17(11), 3207–3216.
236. Yasuda, T., Morimatsu, K., Kato, R., Usukura, J., Takahashi, M., and Ohmori, H. (2001). Physical interactions between DinI and RecA nucleoprotein filament for the regulation of SOS mutagenesis. *The EMBO journal*, 20(5), 1192–1202.
237. Yasuda, T., Nagata, T., and Ohmori, H. (1996). Multicopy suppressors of the cold-sensitive phenotype of the pcsA68 (dinD68) mutation in Escherichia coli. *Journal of bacteriology*, 178(13), 3854–3859.
238. Yokogaki, S., Unno, K., Oku, N., and Okada, S. (1995). Chaperonin-repairable subtle incompleteness of protein assembly induced by a substitution of hydrogen with deuterium: effect of GroE on deuterated

- ribulose 1, 5-bisphosphate carboxylase. *Plant and cell physiology*, 36(3), 419-423.
239. Zavlilgelsky, G. B., Kotova, V. Y., and Manukhov, I. V. (2007). Action of 1,1-dimethylhydrazine on bacterial cells is determined by hydrogen peroxide. *Mutation research*, 634(1-2), 172–176.
240. Zeiler, H. J., & Grohe, K. (1984). The in vitro and in vivo activity of ciprofloxacin. *European journal of clinical microbiology*, 3(4), 339–343. <https://doi.org/10.1007/BF01977490>
241. Zhanataev, A. K., Pigarev, S. E., Fedoros, E. I., Panchenko, A. V., Anisina, E. A., Chayka, Z. V., Durnev, A. D., & Anisimov, V. N. (2022). Antigenotoxic and antimutagenic effects of lignin derivative BP-C2 against dioxidine and cyclophosphamide in vivo in murine cells. *Toxicology reports*, 9, 743–749. <https://doi.org/10.1016/j.toxrep.2022.03.041>
242. Zhang, A. P., Pigli, Y. Z., and Rice, P. A. (2010). Structure of the LexA-DNA complex and implications for SOS box measurement. *Nature*, 466(7308), 883–886.
243. Zimmermann, A., Keller, H. U., and Cottier, H. (1988). Heavy water (D<sub>2</sub>O)-induced shape changes, movements and F-actin redistribution in human neutrophil granulocytes. *European journal of cell biology*, 47(2), 320–326.

## ПРИЛОЖЕНИЯ

**Приложение 1.** Минимальные дозы индукторов, достоверно повышающие уровень люминесценции биосенсоров PColD, PRecA, PDinI и PAlkA (время инкубации 60 и 90 минут)

Химическое соединение	PColD		PRecA		PDinI		PAlkA	
	60'	90'	60'	90'	60'	90'	60'	90'
Митомицин С	$5 \times 10^{-8}$ ( $7,3 \times 10^{-4}$ )*	$5 \times 10^{-8}$ ( $6,7 \times 10^{-4}$ )	$5 \times 10^{-7}$ ( $4,5 \times 10^{-7}$ )	$5 \times 10^{-8}$ ( $3,4 \times 10^{-3}$ )	$5 \times 10^{-8}$ ( $6,6 \times 10^{-9}$ )	$5 \times 10^{-8}$ ( $1,9 \times 10^{-11}$ )	-**	-
Диоксидин	$10^{-9}$ ( $2,7 \times 10^{-2}$ )	$10^{-9}$ ( $5,2 \times 10^{-5}$ )	$10^{-11}$ ( $1,3 \times 10^{-2}$ )	$10^{-11}$ ( $1,6 \times 10^{-4}$ )	$10^{-10}$ ( $1,7 \times 10^{-4}$ )	$10^{-12}$ ( $1,5 \times 10^{-2}$ )	-	-
Фурацилин	$10^{-5}$ ( $1,2 \times 10^{-2}$ )	$5 \times 10^{-6}$ ( $2,5 \times 10^{-2}$ )	$2,5 \times 10^{-6}$ ( $8,3 \times 10^{-8}$ )	$10^{-6}$ ( $1,1 \times 10^{-5}$ )	$10^{-6}$ ( $1,0 \times 10^{-3}$ )	$10^{-6}$ ( $2,0 \times 10^{-8}$ )	-	-
4-НХО	$2 \times 10^{-5}$ ( $2,6 \times 10^{-6}$ )	$2 \times 10^{-5}$ ( $3,5 \times 10^{-10}$ )	$2 \times 10^{-5}$ ( $4,5 \times 10^{-6}$ )	$2 \times 10^{-5}$ ( $2,2 \times 10^{-6}$ )	$2 \times 10^{-5}$ ( $1,1 \times 10^{-13}$ )	$2 \times 10^{-5}$ ( $1,1 \times 10^{-15}$ )	-	-
Налидиксовая кислота	$5 \times 10^{-5}$ ( $6,0 \times 10^{-4}$ )	$5 \times 10^{-5}$ ( $1,3 \times 10^{-4}$ )	$5 \times 10^{-5}$ ( $4,2 \times 10^{-5}$ )	$10^{-5}$ ( $1,1 \times 10^{-2}$ )	$5 \times 10^{-5}$ ( $4,3 \times 10^{-4}$ )	$5 \times 10^{-5}$ ( $1,5 \times 10^{-3}$ )	-	-
Ципрофлоксацин	$5 \times 10^{-8}$ ( $2,8 \times 10^{-4}$ )	$5 \times 10^{-8}$ ( $7,0 \times 10^{-6}$ )	$5 \times 10^{-8}$ ( $1,2 \times 10^{-7}$ )	$5 \times 10^{-8}$ ( $8,3 \times 10^{-10}$ )	$5 \times 10^{-8}$ ( $3,1 \times 10^{-10}$ )	$5 \times 10^{-8}$ ( $1,6 \times 10^{-12}$ )	-	-
НММ	$5 \times 10^{-4}$ ( $4,0 \times 10^{-8}$ )	$5 \times 10^{-4}$ ( $2,5 \times 10^{-6}$ )	$5 \times 10^{-4}$ ( $1,8 \times 10^{-9}$ )	$5 \times 10^{-4}$ ( $1,1 \times 10^{-8}$ )	$5 \times 10^{-4}$ ( $6,9 \times 10^{-13}$ )	$5 \times 10^{-4}$ ( $8,9 \times 10^{-14}$ )	$5 \times 10^{-5}$ ( $9,2 \times 10^{-9}$ )	$5 \times 10^{-5}$ ( $1,4 \times 10^{-9}$ )
ММС	$10^{-4}$ ( $3,3 \times 10^{-3}$ )	$10^{-4}$ ( $1,5 \times 10^{-3}$ )	$10^{-4}$ ( $3,8 \times 10^{-8}$ )	$10^{-4}$ ( $3,0 \times 10^{-10}$ )	$10^{-4}$ ( $9,3 \times 10^{-10}$ )	$10^{-4}$ ( $3,4 \times 10^{-11}$ )	$5 \times 10^{-4}$ ( $2,4 \times 10^{-6}$ )	$5 \times 10^{-4}$ ( $1,1 \times 10^{-7}$ )
Перекись водорода	$10^{-3}$ ( $1,2 \times 10^{-10}$ )	$10^{-3}$ ( $3,3 \times 10^{-8}$ )	$10^{-3}$ ( $3,1 \times 10^{-18}$ )	$10^{-3}$ ( $1,7 \times 10^{-14}$ )	$10^{-3}$ ( $9,7 \times 10^{-14}$ )	$10^{-3}$ ( $1,8 \times 10^{-16}$ )	-	-
Цис-платина	$5 \times 10^{-5}$ ( $8,5 \times 10^{-5}$ )	$10^{-5}$ ( $1,7 \times 10^{-3}$ )	$5 \times 10^{-6}$ ( $3,7 \times 10^{-3}$ )	$5 \times 10^{-6}$ ( $4,1 \times 10^{-7}$ )	$5 \times 10^{-6}$ ( $5,6 \times 10^{-4}$ )	$10^{-6}$ ( $1,4 \times 10^{-5}$ )	-	-
Стрептозотоцин	$5 \times 10^{-5}$ ( $4,7 \times 10^{-6}$ )	$5 \times 10^{-5}$ ( $1,2 \times 10^{-5}$ )	$10^{-5}$ ( $6,5 \times 10^{-9}$ )	$10^{-5}$ ( $9,7 \times 10^{-8}$ )	$10^{-7}$ ( $3,8 \times 10^{-7}$ )	$10^{-7}$ ( $1,8 \times 10^{-9}$ )	$10^{-9}$ ( $1,4 \times 10^{-6}$ )	$10^{-9}$ ( $8,6 \times 10^{-8}$ )

9-АА	$5 \times 10^{-2}$ ( $1,4 \times 10^{-2}$ )	$10^{-2}$ ( $7,4 \times 10^{-3}$ )	$5 \times 10^{-2}$ ( $3,4 \times 10^{-2}$ )	$5 \times 10^{-2}$ ( $6,0 \times 10^{-3}$ )	-	$2,5 \times 10^{-2}$ ( $1,3 \times 10^{-2}$ )	-	-
Бромистый этидий	-	-	-	-	$10^{-6}$ ( $5,9 \times 10^{-8}$ )	-	-	-
2-Аминопурин	$10^{-4}$ ( $10^{-3}$ )	$10^{-4}$ ( $3,5 \times 10^{-2}$ )	$2,5 \times 10^{-4}$ ( $3,0 \times 10^{-4}$ )	$10^{-4}$ ( $1,7 \times 10^{-3}$ )	-	$10^{-4}$ ( $1,3 \times 10^{-2}$ )	-	-
5-Бромурацил	$7,5 \times 10^{-3}$ ( $1,9 \times 10^{-2}$ )	$2,5 \times 10^{-3}$ ( $1,7 \times 10^{-2}$ )	$5 \times 10^{-3}$ ( $3,8 \times 10^{-2}$ )	$10^{-3}$ ( $2,2 \times 10^{-2}$ )	$10^{-3}$ ( $10^{-2}$ )	$5 \times 10^{-4}$ ( $1,8 \times 10^{-3}$ )	-	-
5-Фторурацил	-	$7,5 \times 10^{-4}$ ( $8,4 \times 10^{-3}$ )	-	$2,5 \times 10^{-4}$ ( $2,8 \times 10^{-3}$ )	$2,5 \times 10^{-4}$ ( $4,2 \times 10^{-8}$ )	$10^{-4}$ ( $3,1 \times 10^{-10}$ )	-	-
УФ	30*** ( $3,9 \times 10^{-4}$ )	30 ( $1,2 \times 10^{-4}$ )	30 ( $1,4 \times 10^{-2}$ )	30 ( $7,8 \times 10^{-4}$ )	30 ( $5,6 \times 10^{-4}$ )	30 ( $1,6 \times 10^{-8}$ )	-	-

\* - в скобках указаны значения *p-value*

\*\* - значимое повышение люминесценции относительно спонтанного уровня не наблюдалось

\*\*\*- дозы для УФ приведены в единицах Дж/м<sup>2</sup>

**Приложение 2.** Модифицирующее действие дейтерия на ДНК-повреждающую активность генотоксикантов при предварительном дейтерировании биосенсоров PColD, PRecA и PDinI в течение 90 минут.

Индуктор, концентрация моль/л*	PColD				PRecA				PDinI			
	5%	7,5%	9%	10%	5%	7,5%	9%	10%	5%	7,5%	9%	10%
Митомин С, $5 \times 10^{-8}$	1,61 $9,2 \times 10^{-6}$ **	1,70 $2,9 \times 10^{-7}$	1,75 $4,1 \times 10^{-6}$	1,52 $6,2 \times 10^{-5}$	1,29 $5,1 \times 10^{-8}$	1,30 $7,9 \times 10^{-8}$	1,34 $4,5 \times 10^{-4}$	1,25 $4,5 \times 10^{-4}$	1,67 $1,0 \times 10^{-10}$	1,65 $2,5 \times 10^{-12}$	1,61 $5,8 \times 10^{-9}$	1,60 $1,0 \times 10^{-8}$
Диоксидин, $10^{-5}$	1,43 $4,5 \times 10^{-5}$	1,54 $3,9 \times 10^{-7}$	1,57 $5,9 \times 10^{-6}$	1,36 $6,3 \times 10^{-5}$	0,93 $2,2 \times 10^{-1}$	0,95 $3,7 \times 10^{-1}$	0,95 $3,5 \times 10^{-1}$	1,02 $7,1 \times 10^{-1}$	1,10 $2,7 \times 10^{-2}$	1,16 $9,4 \times 10^{-4}$	1,17 $1,7 \times 10^{-3}$	0,98 $5,7 \times 10^{-1}$
Фурацилин, $2,5 \times 10^{-6}$	2,0 $8,2 \times 10^{-4}$	4,0 $1,8 \times 10^{-9}$	2,8 $3,1 \times 10^{-4}$	2,7 $5,3 \times 10^{-7}$	2,2 $9,4 \times 10^{-13}$	2,5 $3,8 \times 10^{-11}$	1,4 $1,0 \times 10^{-6}$	0,9 $2,7 \times 10^{-2}$	1,6 $1,5 \times 10^{-6}$	1,6 $9,6 \times 10^{-6}$	2,0 $2,8 \times 10^{-8}$	1,9 $1,2 \times 10^{-7}$
4-НХО, $8 \times 10^{-5}$	1,86 $9,8 \times 10^{-7}$	1,97 $2,9 \times 10^{-6}$	1,98 $1,7 \times 10^{-5}$	2,08 $4,3 \times 10^{-9}$	1,49 $5,4 \times 10^{-6}$	1,63 $1,8 \times 10^{-4}$	1,82 $1,0 \times 10^{-9}$	1,69 $3,0 \times 10^{-8}$	1,44 $1,1 \times 10^{-4}$	1,64 $2,0 \times 10^{-6}$	1,83 $1,4 \times 10^{-7}$	1,70 $4,7 \times 10^{-6}$
Налидиксовая кислота, $10^{-3}$	1,68 $7,1 \times 10^{-5}$	2,31 $9,4 \times 10^{-12}$	2,36 $7,0 \times 10^{-7}$	2,21 $1,8 \times 10^{-9}$	1,33 $2,2 \times 10^{-8}$	1,40 $1,1 \times 10^{-9}$	1,24 $2,3 \times 10^{-3}$	1,05 $1,8 \times 10^{-1}$	1,52 $2,9 \times 10^{-4}$	1,80 $4,5 \times 10^{-5}$	1,97 $1,7 \times 10^{-6}$	1,85 $1,1 \times 10^{-5}$

Ципрофлоксацин, $5 \times 10^{-6}$	0,93 $6,4 \times 10^{-2}$	0,87 $3,5 \times 10^{-4}$	0,88 $6,8 \times 10^{-4}$	0,91 $4,7 \times 10^{-3}$	0,96 $5,2 \times 10^{-1}$	0,96 $4,5 \times 10^{-1}$	0,88 $1,7 \times 10^{-2}$	0,84 $5,1 \times 10^{-3}$	0,96 $3,5 \times 10^{-2}$	0,91 $7,4 \times 10^{-3}$	0,89 $1,4 \times 10^{-4}$	0,86 $5,0 \times 10^{-5}$
НММ, $10^{-3}$	1,50 $5,7 \times 10^{-6}$	1,54 $4,2 \times 10^{-7}$	1,47 $2,1 \times 10^{-6}$	1,36 $6,6 \times 10^{-5}$	1,39 $2,7 \times 10^{-4}$	1,46 $7,1 \times 10^{-6}$	1,52 $1,0 \times 10^{-6}$	1,29 $1,1 \times 10^{-4}$	0,95 $3,4 \times 10^{-1}$	1,10 $1,2 \times 10^{-1}$	1,16 $1,6 \times 10^{-2}$	1,03 $5,8 \times 10^{-1}$
ММС, $5 \times 10^{-4}$	1,09 $1,4 \times 10^{-1}$	0,99 $8,3 \times 10^{-1}$	0,95 $3,0 \times 10^{-1}$	1,18 $9,2 \times 10^{-3}$	1,21 $3,3 \times 10^{-5}$	1,24 $9,0 \times 10^{-5}$	1,14 $3,0 \times 10^{-3}$	1,00 $8,8 \times 10^{-1}$	1,08 $4,9 \times 10^{-4}$	1,24 $4,7 \times 10^{-5}$	1,47 $3,4 \times 10^{-6}$	1,38 $9,6 \times 10^{-7}$
Перекись водорода, $2,5 \times 10^{-4}$	0,99 $8,1 \times 10^{-1}$	1,17 $7,0 \times 10^{-3}$	1,06 $5,0 \times 10^{-1}$	1,02 $6,3 \times 10^{-1}$	0,96 $3,9 \times 10^{-1}$	1,08 $1,7 \times 10^{-1}$	1,08 $4,0 \times 10^{-2}$	1,10 $1,3 \times 10^{-2}$	0,97 $6,0 \times 10^{-1}$	1,02 $7,0 \times 10^{-1}$	1,10 $9,3 \times 10^{-2}$	1,11 $1,6 \times 10^{-1}$
Цис-платина, $5 \times 10^{-5}$	1,31 $1,7 \times 10^{-4}$	1,36 $1,4 \times 10^{-5}$	1,44 $5,4 \times 10^{-6}$	1,27 $1,6 \times 10^{-4}$	1,16 $2,6 \times 10^{-5}$	1,16 $1,2 \times 10^{-4}$	1,16 $6,0 \times 10^{-5}$	1,09 $5,2 \times 10^{-3}$	1,06 $3,8 \times 10^{-1}$	1,11 $3,3 \times 10^{-2}$	1,22 $1,3 \times 10^{-3}$	1,30 $6,1 \times 10^{-5}$
Стрептозоцин, $10^{-5}$	1,16 $6,6 \times 10^{-3}$	1,24 $1,9 \times 10^{-2}$	1,35 $2,2 \times 10^{-5}$	1,51 $2,0 \times 10^{-7}$	1,11 $3,1 \times 10^{-3}$	1,13 $2,5 \times 10^{-2}$	1,16 $1,2 \times 10^{-3}$	1,14 $1,0 \times 10^{-3}$	1,15 $2,5 \times 10^{-3}$	1,18 $1,1 \times 10^{-3}$	1,14 $5,0 \times 10^{-3}$	1,12 $4,5 \times 10^{-3}$
9-АА, $5 \times 10^{-2}$	0,96 $4,3 \times 10^{-1}$	0,88 $3,9 \times 10^{-2}$	0,87 $2,4 \times 10^{-2}$	0,77 $3,7 \times 10^{-4}$	0,84 $1,9 \times 10^{-4}$	0,81 $2,3 \times 10^{-7}$	0,79 $1,1 \times 10^{-12}$	0,67 $1,5 \times 10^{-7}$	0,95 $3,5 \times 10^{-1}$	0,82 $1,6 \times 10^{-3}$	0,81 $6,8 \times 10^{-5}$	0,78 $7,5 \times 10^{-5}$
2-аминопурин, $2,5 \times 10^{-3}$	1,02 $7,4 \times 10^{-1}$	1,49 $5,4 \times 10^{-5}$	1,46 $7,9 \times 10^{-5}$	1,51 $6,5 \times 10^{-5}$	1,16 $1,1 \times 10^{-2}$	1,34 $1,7 \times 10^{-6}$	1,63 $1,2 \times 10^{-5}$	1,22 $6,4 \times 10^{-4}$	1,27 $6,9 \times 10^{-5}$	1,64 $2,9 \times 10^{-8}$	2,22 $2,1 \times 10^{-7}$	2,14 $5,5 \times 10^{-6}$
5-бромурацил, $10^{-2}$	0,90 $3,9 \times 10^{-1}$	0,81 $8,3 \times 10^{-2}$	0,82 $1,1 \times 10^{-1}$	0,75 $1,4 \times 10^{-2}$	0,87 $9,6 \times 10^{-2}$	0,82 $3,7 \times 10^{-2}$	0,77 $1,0 \times 10^{-3}$	0,75 $6,5 \times 10^{-4}$	0,98 $5,1 \times 10^{-1}$	1,01 $6,6 \times 10^{-1}$	0,82 $2,3 \times 10^{-4}$	0,81 $9,9 \times 10^{-4}$
5-фторурацил, $5 \times 10^{-4}$	0,91 $1,0 \times 10^{-1}$	0,91 $2,0 \times 10^{-1}$	0,92 $1,7 \times 10^{-1}$	1,09 $3,0 \times 10^{-1}$	0,76 $2,6 \times 10^{-4}$	0,88 $2,9 \times 10^{-2}$	0,78 $1,4 \times 10^{-4}$	0,89 $8,8 \times 10^{-3}$	0,95 $2,5 \times 10^{-1}$	0,97 $2,6 \times 10^{-1}$	0,97 $3,9 \times 10^{-1}$	0,91 $7,5 \times 10^{-4}$
УФ, $60 \text{ Дж/м}^2$	0,91 $4,3 \times 10^{-1}$	0,95 $6,6 \times 10^{-1}$	0,93 $5,0 \times 10^{-1}$	1,15 $3,3 \times 10^{-1}$	0,87 $3,8 \times 10^{-2}$	0,94 $3,5 \times 10^{-1}$	0,89 $1,1 \times 10^{-1}$	1,06 $4,5 \times 10^{-1}$	1,21 $1,7 \times 10^{-2}$	1,25 $2,4 \times 10^{-3}$	1,21 $2,7 \times 10^{-3}$	1,11 $1,3 \times 10^{-1}$

\* - для УФ дозы представлены в единицах Дж/м<sup>2</sup>

\*\* - указаны значения *p-value*

(Серым цветом выделены значения, не достигшие уровня значимости  $p < 0,05$ )

**Приложение 3.** Модифицирующее действие дейтерия на ДНК-повреждающую активность генотоксикантов при совместной инкубации биосенсоров PColD, PRecA и PDinI в среде с содержанием дейтерия и индукторов.

Индуктор, концентрация <i>моль/л</i> *	PColD				PRecA				PDinI			
	5%	7,5%	9%	10%	5%	7,5%	9%	10%	5%	7,5%	9%	10%
Митомицин С, $5 \times 10^{-8}$	0,62 $2,4 \times 10^{-4}$	0,60 $1,7 \times 10^{-4}$	0,59 $1,1 \times 10^{-5}$	0,55 $2,1 \times 10^{-5}$	0,98 $5,5 \times 10^{-1}$	0,95 $1,3 \times 10^{-1}$	1,00 $1,1 \times 10^{-1}$	1,00 $1,5 \times 10^{-1}$	1,11 $1,0 \times 10^{-2}$	1,17 $3,9 \times 10^{-3}$	1,24 $1,1 \times 10^{-4}$	1,21 $1,4 \times 10^{-4}$
Диоксидин, $10^{-5}$	0,98 $8,0 \times 10^{-1}$	0,92 $3,4 \times 10^{-1}$	0,99 $8,8 \times 10^{-1}$	1,12 $1,7 \times 10^{-1}$	0,98 $5,1 \times 10^{-1}$	0,97 $4,1 \times 10^{-1}$	0,96 $2,6 \times 10^{-1}$	0,90 $1,0 \times 10^{-2}$	1,15 $3,1 \times 10^{-2}$	1,04 $4,1 \times 10^{-1}$	1,06 $1,9 \times 10^{-1}$	1,05 $3,8 \times 10^{-1}$

Фурацилин, $2,5 \times 10^{-6}$	0,95 $4,4 \times 10^{-1}$	1,15 $2,5 \times 10^{-1}$	1,07 $5,5 \times 10^{-1}$	0,97 $7,3 \times 10^{-1}$	1,16 $1,2 \times 10^{-4}$	1,34 $5,0 \times 10^{-8}$	1,08 $6,1 \times 10^{-2}$	0,93 $5,1 \times 10^{-2}$	1,29 $3,9 \times 10^{-4}$	1,15 $3,8 \times 10^{-3}$	1,02 $7,0 \times 10^{-1}$	1,30 $4,0 \times 10^{-5}$
4-НХО, $8 \times 10^{-5}$	0,81 $9,1 \times 10^{-3}$	0,93 $3,0 \times 10^{-1}$	0,80 $4,7 \times 10^{-3}$	0,49 $3,3 \times 10^{-6}$	0,75 $1,1 \times 10^{-4}$	0,77 $1,5 \times 10^{-3}$	0,61 $5,6 \times 10^{-8}$	0,62 $9,1 \times 10^{-8}$	1,11 $9,8 \times 10^{-2}$	0,94 $2,4 \times 10^{-1}$	0,76 $7,3 \times 10^{-5}$	0,84 $1,6 \times 10^{-2}$
Налидиксовая кислота, $10^{-3}$	0,95 $4,8 \times 10^{-1}$	1,00 $5,2 \times 10^{-1}$	0,97 $4,6 \times 10^{-1}$	0,86 $3,4 \times 10^{-2}$	1,04 $6,0 \times 10^{-1}$	1,04 $2,8 \times 10^{-1}$	1,07 $3,4 \times 10^{-2}$	1,00 $7,9 \times 10^{-2}$	1,09 $1,8 \times 10^{-1}$	1,01 $1,8 \times 10^{-1}$	1,04 $4,5 \times 10^{-2}$	1,04 $7,0 \times 10^{-3}$
Ципрофлоксацин, $5 \times 10^{-6}$	0,82 $3,1 \times 10^{-2}$	0,93 $5,5 \times 10^{-3}$	0,89 $1,9 \times 10^{-4}$	0,74 $9,7 \times 10^{-8}$	1,00 $9,8 \times 10^{-1}$	0,97 $2,7 \times 10^{-1}$	0,96 $1,9 \times 10^{-2}$	1,00 $2,8 \times 10^{-2}$	0,89 $1,6 \times 10^{-1}$	0,88 $5,3 \times 10^{-4}$	0,95 $9,7 \times 10^{-6}$	0,96 $9,1 \times 10^{-6}$
НММ, $10^{-3}$	0,84 $6,4 \times 10^{-2}$	0,88 $1,3 \times 10^{-1}$	0,88 $9,2 \times 10^{-2}$	0,83 $1,7 \times 10^{-3}$	1,14 $5,0 \times 10^{-3}$	1,15 $1,3 \times 10^{-3}$	1,16 $1,7 \times 10^{-3}$	1,05 $2,7 \times 10^{-1}$	1,07 $3,0 \times 10^{-3}$	1,09 $6,6 \times 10^{-3}$	1,07 $1,4 \times 10^{-2}$	1,08 $5,3 \times 10^{-3}$
ММС, $5 \times 10^{-4}$	0,97 $7,1 \times 10^{-1}$	0,90 $2,6 \times 10^{-1}$	0,85 $9,7 \times 10^{-2}$	0,82 $2,1 \times 10^{-2}$	1,07 $1,6 \times 10^{-1}$	1,13 $5,2 \times 10^{-3}$	1,15 $5,8 \times 10^{-4}$	1,19 $8,5 \times 10^{-6}$	1,04 $1,2 \times 10^{-1}$	1,04 $9,6 \times 10^{-2}$	1,08 $7,3 \times 10^{-3}$	1,04 $1,8 \times 10^{-1}$
Перекись водорода, $2,5 \times 10^{-4}$	0,73 $6,7 \times 10^{-3}$	0,69 $3,5 \times 10^{-3}$	0,71 $5,0 \times 10^{-3}$	0,70 $1,7 \times 10^{-3}$	0,85 $3,8 \times 10^{-2}$	0,91 $1,2 \times 10^{-1}$	0,99 $8,7 \times 10^{-1}$	0,90 $7,9 \times 10^{-2}$	0,93 $3,8 \times 10^{-1}$	0,93 $4,0 \times 10^{-1}$	0,91 $1,9 \times 10^{-1}$	0,83 $6,1 \times 10^{-2}$
Цис-платина, $5 \times 10^{-5}$	0,76 $5,4 \times 10^{-2}$	0,81 $1,2 \times 10^{-1}$	0,86 $2,8 \times 10^{-1}$	0,83 $3,7 \times 10^{-2}$	0,78 $3,4 \times 10^{-5}$	0,81 $2,3 \times 10^{-4}$	0,87 $2,7 \times 10^{-3}$	0,97 $4,4 \times 10^{-1}$	0,97 $6,8 \times 10^{-1}$	0,96 $8,0 \times 10^{-1}$	1,01 $9,4 \times 10^{-1}$	1,01 $8,7 \times 10^{-1}$
Стрептозоцин, $10^{-5}$	0,87 $5,5 \times 10^{-2}$	0,89 $8,5 \times 10^{-2}$	0,97 $6,2 \times 10^{-1}$	1,05 $3,8 \times 10^{-1}$	1,02 $7,0 \times 10^{-1}$	0,98 $6,4 \times 10^{-1}$	0,99 $9,0 \times 10^{-1}$	0,87 $8,1 \times 10^{-3}$	0,92 $1,2 \times 10^{-1}$	0,93 $2,2 \times 10^{-1}$	0,90 $3,2 \times 10^{-2}$	0,78 $2,0 \times 10^{-5}$
9-АА, $5 \times 10^{-2}$	0,84 $7,6 \times 10^{-2}$	1,05 $5,9 \times 10^{-1}$	0,88 $2,0 \times 10^{-1}$	1,07 $7,3 \times 10^{-1}$	0,84 $3,5 \times 10^{-4}$	0,88 $1,4 \times 10^{-4}$	0,84 $3,3 \times 10^{-5}$	0,62 $2,7 \times 10^{-7}$	1,05 $3,6 \times 10^{-1}$	1,19 $3,7 \times 10^{-3}$	1,06 $2,4 \times 10^{-1}$	1,54 $5,6 \times 10^{-3}$
2-аминопурин, $2,5 \times 10^{-3}$	0,72 $5,4 \times 10^{-3}$	0,65 $2,7 \times 10^{-4}$	0,50 $7,7 \times 10^{-6}$	0,47 $5,1 \times 10^{-6}$	1,18 $1,0 \times 10^{-2}$	1,28 $1,5 \times 10^{-4}$	1,01 $8,3 \times 10^{-1}$	0,90 $6,3 \times 10^{-2}$	0,99 $7,9 \times 10^{-1}$	0,92 $7,3 \times 10^{-3}$	0,94 $7,5 \times 10^{-2}$	0,64 $4,2 \times 10^{-9}$
5-бромурацил, $10^{-2}$	0,90 $6,3 \times 10^{-3}$	0,96 $3,6 \times 10^{-1}$	1,10 $4,6 \times 10^{-2}$	1,23 $8,0 \times 10^{-4}$	0,98 $9,1 \times 10^{-1}$	0,71 $6,8 \times 10^{-2}$	0,75 $1,2 \times 10^{-1}$	0,91 $5,6 \times 10^{-1}$	0,90 $2,8 \times 10^{-3}$	0,92 $6,5 \times 10^{-3}$	0,95 $7,3 \times 10^{-2}$	1,03 $2,0 \times 10^{-1}$
5-фторурацил, $5 \times 10^{-4}$	0,89 $1,2 \times 10^{-1}$	0,88 $2,2 \times 10^{-1}$	0,89 $1,7 \times 10^{-1}$	1,10 $3,4 \times 10^{-1}$	0,80 $2,0 \times 10^{-2}$	0,92 $2,9 \times 10^{-1}$	0,81 $2,1 \times 10^{-2}$	1,01 $8,08 \times 10^{-1}$	0,97 $4,8 \times 10^{-1}$	0,98 $4,5 \times 10^{-1}$	0,96 $9,9 \times 10^{-2}$	0,90 $8,1 \times 10^{-5}$
УФ, $60 \text{ Дж/м}^2$	0,72 $1,5 \times 10^{-2}$	0,68 $1,3 \times 10^{-3}$	0,68 $8,4 \times 10^{-3}$	0,54 $7,7 \times 10^{-5}$	0,80 $1,8 \times 10^{-3}$	0,88 $4,1 \times 10^{-2}$	0,77 $1,3 \times 10^{-4}$	0,74 $2,1 \times 10^{-4}$	0,74 $2,1 \times 10^{-3}$	0,74 $2,1 \times 10^{-3}$	0,59 $4,4 \times 10^{-5}$	0,58 $2,6 \times 10^{-5}$

\* - для УФ дозы представлены в единицах Дж/м<sup>2</sup>

\*\* - указаны значения *p-value*

(Серым цветом выделены значения, не достигшие уровня значимости  $p < 0,05$ )

