

Изучение генотоксичности параквата с помощью бактериальных lux-биосенсоров

Мачигов Э.А., Свиридова Д.А., Абилов С.К.

ФГБУН Институт общей генетики им Н.И.Вавилова Российской академии наук
119991, г. Москва, ул. Губкина, д. 3

Показано, что паракват (1,1-диметил-4,4-дипиридилия дихлорид) индуцирует люминесценцию биосенсоров, несущих промоторы генов *soxS* и *katG*, специфично реагирующих на супероксид-анион радикал и перекись водорода, соответственно. Антиоксиданты глутатион и ацетилцистеин снижали уровень как люминесценции биосенсоров, так и разрывов ДНК в бактериальных клетках.

Ключевые слова: биосенсоры, паракват, люминесценция, разрывы ДНК

Для цитирования: Мачигов Э.А., Свиридова Д.А., Абилов С.К. Изучение генотоксичности параквата с помощью бактериальных lux-биосенсоров. Медицинская генетика 2020; 19(9): 63-64.

DOI: 10.25557/2073-7998.2020.09.63-64

Автор для корреспонденции: Мачигов Эльбек Альбертович; **e-mail:** elbek_machigov@mail.ru

Финансирование. Государственное задание.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила: 20.05.2020.

The study of paraquat genotoxicity by bacterial lux-biosensors

Machigov E.A., Sviridova D.A., Abilev S.K.

Vavilov Institute of General Genetics of Russian Academic Science,
Gubkina 3, Moscow, 119991, Russia

It has been shown that paraquat (1,1-dimethyl-4,4-dipyridylum dichloride) induces luminescence of biosensors carrying the promoters of the *soxS* and *katG* genes that specifically react to the superoxide anion radical and hydrogen peroxide. The antioxidants glutathione and acetylcysteine reduced the level of biosensor luminescence and DNA breaks.

Keywords: biosensors, paraquat, luminescence, DNA breaks.

For citation: Machigov E.A., Sviridova D.A., Abilev S.K. The study of paraquat genotoxicity by bacterial lux-biosensors. *Medical genetics*. 2020; 19(9): 63-64. (In Rus)

DOI: 10.25557/2073-7998.2020.09.63-64

Corresponding author: Machigov Elbek Albertovich; **e-mail:** elbek_machigov@mail.ru

Funding. State task.

Conflict of interest. The authors declare that they have no conflict of interest.

Accepted: 20.05.2020.

Паракват (1,1-диметил-4,4-дипиридилия дихлорид) является широко распространенным в мире гербицидом неспецифического действия, высокотоксичным для человека и животных. По химической структуре паракват относится к производным дипиридина. Благодаря своей химической структуре паракват обладает способностью генерировать в клетках живых организмов активные формы кислорода и радикалы, которые повреждают внутриклеточные структуры, включая ДНК [1]. Токсичность, включая и мутагенность, параквата хорошо исследована на лабораторных животных [2]. Однако не достаточных сведений о влиянии гербицида параквата после опрыскивания на почвенную микрофлору, что делает актуальным изучение механизмов его токсического действия на микроорганизмы.

Целью исследования было изучение генотоксических свойства параквата и механизмов его действия на клетки *E. coli*. Для этого были поставлены следующие задачи: изучить влияние параквата на метаболические системы, приводящее к индукции системы антиоксидантной защиты бактерий; определить методом гель-электрофореза способность параквата индуцировать разрывы ДНК бактерий; изучить влияние антиоксидантов на генотоксичность параквата.

Материалы и методы

В работе использовали биосенсоры на основе штамма *E. coli* K12 MG1655, несущие рекомбинантную плазмиду с lux-опероном люминесцирующей бактерии

транскрипционно слитым с промотором гена супероксиддисмутазы *soxS* или с промотором гена каталазы *katG*. Соответственно, биосенсоры, обозначенные как pSoxS-lux и pKatG-lux, люминесцируют в ответ на повышение в бактериальной клетке уровня супероксид-анион радикала или перекисей [3]. Для определения разрывов ДНК бактерий использовали метод гелелектрофореза. Для изучения влияния антиоксидантов на генотоксичность параквата были выбраны ацетилцистеин (АЦЦ) и восстановленный глутатион. Опыты с измерением люминесценции биосенсоров проводили следующим образом: 2 мл 20-часовой ночной культуры штамма добавляли в 20 мл свежего LB-бульона с 20 мкл ампициллина, культивировали два часа при 37°C, после чего разливали по планшетам с добавлением исследуемого вещества в разных концентрациях при соотношении объема культуры и вещества 9:1 и культивировали 90 мин при 37°C. Затем, с помощью люминометра считывали интенсивность люминесценции в условных единицах светового потока. Паракват был взят в 10 разных концентрациях от 0,00005М до 0,1М, а антиоксиданты в концентрациях 0,01М и 0,1М.

Результаты

В результате экспериментов по действию параквата на lux-биосенсоры было показано, что с повышением концентрации параквата люминесцентный ответ pSoxS-lux и pKatG-lux также увеличивался. Если при концентрации параквата 0,00005М люминесцентный ответ pSoxS-lux был всего в 2,8 раз выше контрольного уровня, то при концентрации его 0,01М люминесцентный ответ превышал контрольный уже в 10 раз, и далее с повышением концентрации параквата оставался на том же уровне. При концентрации параквата 0,00005М уровень люминесценции pKatG-lux не отличался от контрольного. Только при увеличении концентрации параквата до 0,005М pKatG-lux показал люминесцентный ответ в 2,9 раз выше контрольного. График зависимости доза-ответ вышел на плато при концентрации параквата в 0,025М, где показал свечение в 6,4 раза выше контрольного уровня. Гелелектрофорез показал, что паракват в концентрациях

от 0,01 до 0,1М вызывает разрывы ДНК у бактерий, что проявляется в виде «шлейфов», длина которых зависит от концентрации гербицида. Глутатион и АЦЦ в концентрациях 0,01М и 0,1М укорачивали длину электрофоретических «шлейфов», то есть проявляли антигенотоксическое действие. Изучение влияния антиоксидантов на люминесценцию биосенсоров показали, что глутатион или АЦЦ в концентрации 0,1М снижают индукцию паракватом свечения у биосенсоров pSoxS-lux и pKatG-lux на 19% и 23%, соответственно.

Паракват вызывает оксидативный стресс в клетках *E. coli* прямо пропорционально концентрации, причем пик активности супероксиддисмутазы достигается при концентрации 0,01М, а пик активности каталазы при 0,025М. Глутатион и АЦЦ в концентрации 0,1М способны подавлять прооксидантное действие параквата, снижая индукцию свечения штаммов в среднем на 20%. Паракват вызывает разрывы ДНК в бактериальных клетках. ДНК-повреждающая активность параквата снижается под действием антиоксидантов.

Литература

1. Shadnia S., Ebadollahi-Natanzi A., Ahmadzadeh S. et al. Delayed death following paraquat poisoning: tree case reports and a literature review. *Toxicol. Res.* 2018;7: 745–760. Doi: 10.1039/c81x00120k
2. Tsai W. T. A review on environmental exposure and health risks of herbicide paraquat.// *Toxicol. Environ. Chem* 2013;. 95:197–206. doi: 10.1080/02772248.2012.761999
3. Котова В.Ю., Манухов И.В., Завильгельский Г.Б. Lux-биосенсоры для детекции SOS-ответа, теплового шока и окислительного стресса. *Биотехнология*. 2009; 6: 16–25. doi 10.1134/S0003683810080089.

References

1. Shadnia S., Ebadollahi-Natanzi A., Ahmadzadeh S. et al. Delayed death following paraquat poisoning: tree case reports and a literature review. *Toxicol. Res.* 2018;7: 745–760. Doi: 10.1039/c81x00120k
2. Tsai W.T. A review on environmental exposure and health risks of herbicide paraquat.// *Toxicol. Environ. Chem* 2013;. 95:197–206. doi: 10.1080/02772248.2012.761999
3. Kotova V.Yu., Manukhov I.V., and Zavigel'skii G.B. Lux-biosensory dlya detektsii SOS-otveta, teplovogo shoka i okislitel'nogo stressa [Lux-biosensors for the detection of SOS-response, heat shock and oxidative stress]. *Biotechnologiya* [Biotechnology] 2009; 6: 16–25. doi 10.1134/S0003683810080089. (In Russ.)