

УДК 632.95.02:575.2:577.3:579.842.11

ГЕНОТОКСИЧЕСКОЕ ДЕЙСТВИЕ РАДИОМИМЕТИКА ПАРАКВАТА НА БАКТЕРИИ *Escherichia coli*

© 2022 г. Э. А. Мачигов¹, Е. В. Игонина¹, Д. А. Свиридова¹, А. В. Рубанович¹, С. К. Абилов^{1,2,*}¹Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН, Москва, Россия²Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

*E-mail: abilev@vigg.ru

Поступила в редакцию 08.11.2021 г.

После доработки 10.02.2022 г.

Принята к публикации 02.03.2022 г.

Паракват в концентрации 0.01 моль/л вызывал интенсивную люминесценцию биосенсоров *E. coli* pSoxS-lux и *E. coli* pKatG-lux, что указывает на образование в клетках бактерий, соответственно, супероксид анион-радикала ($O_2^{\cdot-}$) и пероксид водорода (H_2O_2). В концентрации параквата 0.1 моль/л наблюдалось падение интенсивности люминесценции, биосенсоров, которое было связано со снижением выживаемости бактерий с 4×10^7 в контроле до 1×10^5 колониеобразующих единиц (КОЕ) в опыте. В результате пересчета показателя интенсивности люминесценции на 1000 КОЕ было показано резкое усиление экспрессии гена супероксиддисмутазы с 0.13 в контроле до 4.36 и 119 условных единиц в концентрациях параквата 0.01 и 0.1 моль/л соответственно. Антиоксиданты глутатион и N-ацетилцистеин снижали концентрацию генерированных паракватом свободных радикалов в клетках и повышали выживаемость бактерий. Методом гель-электрофореза выявлена ДНК-повреждающая способность параквата в концентрации 0.1 моль/л, которая снижалась антиоксидантами.

Ключевые слова: паракват, супероксид анион-радикал, пероксид водорода, биосенсоры, *Escherichia coli*, антиоксиданты, выживаемость бактерий, фрагментация ДНК, электрофорез

DOI: 10.31857/S0869803122030055

Паракват (1,1-диметил-4,4-дипиридил дихлорид) является гербицидом неспецифического действия, широко используемым в мире [1, 2]. По химическому строению паракват относится к производным виологена и впервые был синтезирован в 1882 г., а в 1961 г. компания Syngenta стала выпускать его в качестве гербицида для сельского хозяйства. На сегодня в 120 странах паракват является одним из самых широко применяемых гербицидов в мире наряду с глифосатом. Паракват запрещен к использованию в США, в европейских странах и в России. Он также применяется в экспериментальных целях при моделировании окислительного стресса у живых организмов.

Главной причиной токсичности параквата для человека и животных является его цикличное восстановление/окисление, в результате которого в клетке образуется супероксид анион-радикал, реакционная способность которого не очень велика. Однако в результате метаболизма супероксида в клетке образуются пероксид водорода и гидроксильный радикал OH^{\cdot} , обладающие высокой реакционной способностью. Последний вносит основной вклад в генотоксичность и ци-

тотоксичность параквата. В этой связи паракват можно отнести к химическим радиомиметикам.

Паракват проявляет высокую токсичность при попадании в организм человека и животных. Так, LD_{50} параквата для взрослого самца крысы составляет 57 мг/кг при пероральном поступлении. Паракват накапливается в тканях, особенно в легких, и способен попадать в организм перорально, респираторно и кожным путем [1–4]. Вызывает нарушение цепи переноса электронов в митохондриях [5], что приводит к обширному повреждению митохондрий и токсичности для клеток [5–7]. Первым осложнением может стать отек, за которым наступает стадия фиброза легочной ткани [2, 4]. При попадании в почки вызывает острую почечную недостаточность [8–10]. Описаны случаи токсического миокардита, вызванного отравлением паракватом [2, 3, 11]. Паракват способен преодолевать гематоэнцефалический барьер и поражать нервную систему, особенно дофаминергические нейроны [12]. Паракват может проникать через плаценту, накапливаясь в концентрации, шестикратно превышающей таковую в организме матери. Плод хуже переносит воздей-

ствии параквата на более поздних стадиях беременности, особенно после 30-й недели, когда он подвергается интоксикации, что ведет к летальному исходу [1, 2, 9].

Цитотоксические эффекты параквата в животных организмах обеспечиваются окислительно-восстановительными реакциями, включающими перенос электрона на НАДФ, образованием НАДФН и свободных радикалов. Катализируют эти реакции микросомальные редуктазы цитохрома P450 [1, 2]. Одним из образующихся окислительных соединений является также пероксид водорода. Он отвечает за перекисное окисление мембранных липидов клеток [1, 2, 8]. Супероксид-анион и перекись водорода вступают в катализируемую железом реакцию Габера–Вейса, с образованием гидроксильного радикала и молекулярного кислорода. В целом механизм токсичности параквата основан на цикле окисления и восстановления с участием фермента супероксиддисмутазы, метаболизирующим супероксид-анион [5, 13, 14].

Эпидемиологические исследования показали, что паракват увеличивает частоту некоторых видов рака кожи, таких как рак губ, рак полового члена, немеланомный рак кожи, меланома кожи и плоскоклеточный рак кожи [6, 15, 16]. Слабая потенциальная мутагенная и генотоксическая активность параквата была показана в клеточных культурах *in vitro*. Он значительно увеличивал частоту хромосомных aberrаций, микроядер, сестринских хроматидных обменов и разрывов цепей ДНК в культурах лимфоцитов периферической крови человека [13, 17] и трансформированных клеточных линиях человека (HeLa и Her G2) [18]. Паракват также индуцировал хромосомные aberrации, повреждения ДНК и мутации в клеточных линиях рака легких человека [19] и клетках китайского хомяка V79 [7, 20]. В некоторых модельных исследованиях на животных было обнаружено, что паракват увеличивает уровень окисленного гуанина (8-OG) в клетках различных органов крыс [21], хромосомные aberrации в клетках костного мозга мыши [22], аномалии формы сперматозоидов у грызунов [22, 29] и повреждения ДНК в эритроцитах головастика [24]. Метаболиты параквата в клетке вызывают окисление гуанина, и образовавшийся 8-оксогуанин (8-OG) в результате репликации приводит к замене GC в AT [21, 25]. Однако есть исследования, в которых не удалось обнаружить увеличение частоты мутаций гена HPRT (гипоксантин фосфорибозил-трансферазы) в клетках китайского хомяка V79 [7] и повышение уровня 8-OG в органах крыс даже при токсических дозах параквата [25].

В почве паракват может медленно разлагаться некоторыми видами микроорганизмов со скоростью 5% в год [2]. Изучение мутагенной активности

параквата для микроорганизмов является актуальной задачей в связи с возможностью появления новых мутантных почвенных микроорганизмов при накоплении этого гербицида в почве. Паракват проявлял мутагенную активность в тесте Эймса на тест-штаммах *S. typhimurium* [26] и увеличил частоту мутаций устойчивости к стрептомицину и прототрофности по аргинину у *E. coli* в аэробных условиях [27], а также индуцировал устойчивость к 8-азагуанину и вызывал летальные рецессивные повреждения ДНК у *Aspergillus nidulans* [28]. Имеются противоречивые данные о способности параквата индуцировать SOS-ответ в клетках *E. coli* [26, 29].

Целью настоящей работы является изучение механизма токсического и генотоксического действия параквата на бактерии с помощью lux-биосенсора *E. coli* и влияния антиоксидантов N-ацетилцистеина и глутатиона на его ДНК-повреждающую активность.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Химические соединения. Все использованные химические вещества были аналитической чистоты. Паракват (метилвиологен) был приобретен у фирмы “Sigma Aldrich”, N-ацетилцистеин (ACC) приобрели у компании “Serva” (Германия), глутатион восстановленный (GSH) был получен из фирмы “AppliChemGmbH” (Германия). Все необходимые разведения веществ готовили *ex tempore*.

Штаммы lux-биосенсоров. В работе использовали два вида lux-биосенсоров, полученных на основе штамма *E. coli* K12: MG1655 (pSoxS-lux) и MG1655 (pKatG-lux). Lux-биосенсоры, используемые в работе, получены путем трансформации в бактерии *E. coli* K12 MG1655 биосенсорных плазмид, которые содержат промоторы гена супероксиддисмутазы *soxS* и гена каталазы *katG*, соединенную с lux-опероном *Photobacterium luminescens*, люминесцирующего прокариотического организма. Далее в тексте биосенсор с промотором гена *soxS* будет обозначаться как pSoxS-lux, а биосенсор с промотором гена *katG* – как pKatG-lux.

Механизм работы биосенсора следующий. Ген супероксиддисмутазы изначально находится в состоянии с заблокированным промотором. Супероксид-анион, при образовании в клетке бактерий, реагирует с белком SoxR, который вследствие этого разблокирует промотор, в результате чего lux-оперон транскрибируется и биосенсор pSoxS-lux люминесцирует [29, 30]. Подобным же образом выглядит механизм действия биосенсора pKatG-lux. Пероксид водорода, при появлении в клетке, в результате реакции с белком-активатором приводит к разблокировке промотора, в результате чего lux-оперон транскрибируется и био-

сенсор pKatG-lux люминесцирует. Данная методика позволяет детектировать увеличение в клетке концентрации перекиси водорода в случае люминесцентного ответа pKatG-lux и концентрации супероксид-аниона в случае люминесцентного ответа pSoxS-lux. Биосенсоры предоставлены Г.Б. Завильгельским и И.В. Мануховым (ГосНИИгенетика, Москва).

Условия культивирования биосенсоров. Инкубация и хранение бактериальных культур осуществлялись с помощью сред LB (Луриа–Бертрани), жидких и твердых, с добавлением агара. Среды содержали ампициллин в концентрации 100 мкг/мл. опыты проводились на жидких культурах биосенсоров pKatG-lux и pSoxS-lux, после 12-часовой инкубации при 37°C.

Детекция люминесцентного ответа биосенсоров. Культуры биосенсоров pKatG-lux и pSoxS-lux, инкубированные в течение 12 ч, разбавляли в свежей жидкой среде LB, доводя содержание бактерий до концентрации 10^7 кл/мл, и инкубировали при 37°C в течение 120 мин с аэрацией, до достижения ранней экспоненциальной фазы. Далее культуры переносили в 96-луночный планшет по 160 мкл в каждую лунку. Ряд контрольного образца заполнялся дистиллированной водой по 40 мкл в лунку, следующие же ряды лунок заполнялись по 20 мкл воды в каждую лунку и по 20 мкл различных разведений параквата. При рассмотрении влияния антиоксидантов на действие параквата вместо дистиллированной воды добавляли по 20 мкл в лунку раствора ацетилцистеина или восстановленного глутатиона. Далее культуры в заполненных планшетах культивировали течение 1.5 ч при 37°C в. Затем измеряли люминесцентный ответ с помощью люминометра – микропланшетного ридера “StatFax 4400, Awareness Technology Inc.” (США), где за единицу измерения для люминесцентного ответа принимали условные единицы светового потока (RLU). Вышеперечисленные опыты проводились минимум по 3 раза с восемью повторениями в каждом.

Определение выживаемости бактерий Escherichia coli. Для определения влияния исследуемых веществ на выживаемость биосенсоров культуры биосенсоров pKatG-lux и pSoxS-lux, инкубированные в течение 12 ч, разбавляли в свежей жидкой среде LB, доводя содержание бактерий приблизительно до концентрации 10^7 кл/мл. Затем инкубировали при 37°C в течение 120 мин с аэрацией до достижения ранней экспоненциальной фазы. По 200 мкл различных разведений параквата добавляли в 2 мл бактериальной жидкой культуры. В опытах с использованием антиоксидантов добавляли по 100 мкл различных разведений ацетилцистеина и глутатиона. Далее обработанную паракватом и антиоксидантами культуру биосенсоров культивировали при 37°C в течение

1.5 ч. Затем инкубированную культуру биосенсоров пошагово разбавляли в физиологическом изотоническом растворе в 10^5 раз, и сеяли по 100 мкл из разных разбавлений на чашки Петри с твердой средой LB. После 20 ч выращивания при 37°C подсчитывали число колониеобразующих единиц (КОЕ), которое соответствует числу колоний.

Определение разрывов ДНК методом гель-электрофореза. Ночные культуры биосенсоров pKatG-lux и pSoxS-lux, инкубированные в течение 12 ч, разбавляли в свежей жидкой среде LB, доводя содержание бактерий приблизительно до концентрации 10^7 кл/мл. Затем инкубировали при 37°C в течение 120 мин с аэрацией до достижения ранней экспоненциальной фазы. Далее по 1 мл различных разведений параквата и по 1 мл раствора глутатиона или ацетилцистеина добавляли в 8 мл бактериальной культуры.

Затем культивировали бактерии с добавленными веществами в течение 1.5 ч при 37°C и после центрифугирования отмывали изотоническим физиологическим раствором. После очередного центрифугирования и слива супернатанта растворяли осадок пипетированием в 350 мкл лизирующего раствора (0.1 ммоль/л ЭДТА, 0.5 моль/л NaOH, 0.05% SDS). Далее выдерживали в лизирующем растворе в течение 1.5 ч при 37°C. Затем 35 мкл лизированной бактериальной культуры добавляли в лунки агарозной пластины с содержанием агарозы в геле, равным 1%, и содержанием бромида этидия 10 мкл/100 мл. Маркерную ДНК помещали в первую лунку в объеме 5 мкл. Далее агарозную гелевую пластину устанавливали в ванночке для электрофореза, наполненной буфером TBE. Электрофорез проводили в течение 1.5 ч при 100 В. На последнем этапе с помощью трансиллюминатора “Vilber Lourmat serial N 10 102939” (Франция) осуществляли визуализацию результата посредством флуоресценции штрихов ДНК под действием УФ-излучения и фотографировали.

Статистическая обработка. Полученные в ходе опытов данные были подвергнуты статистической обработке с вычислением среднего значения показателя и его ошибки. Значимость различий средних значений вычисляли с помощью *t*-критерия Стьюдента. Для вывода о статистической значимости различий полученных данных считали достаточной вероятность ошибки $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Результаты изучения люминесценции биосенсоров pKatG-lux и pSoxS-lux в ответ на действие параквата в концентрациях от 10^{-6} до 10^{-1} моль/л в течение 90 мин приведены на рис. 1. Из представленных данных следует, что паракват генери-

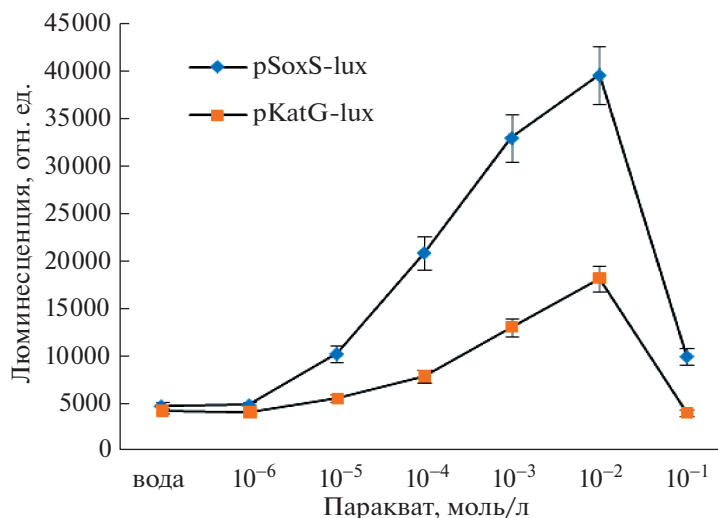


Рис. 1. Зависимость люминесценции биосенсоров pKatG-lux и pSoxS-lux от концентрации параквата.
Fig. 1. Dependence of the luminescence of the pKatG-lux and pSoxS-lux biosensors on the paraquat concentration.

рует в клетках *E. coli* супероксид анион-радикал и пероксид водорода, регистрируемые по свечению биосенсоров pSoxS-lux и pKatG-lux соответственно. Максимальная индукция люминесценции у биосенсоров наблюдалась в концентрации параквата 10⁻² моль/л. Тогда как в концентрации параквата 10⁻¹ моль/л регистрировали снижение свечения биосенсоров, которое может быть связано с его токсичностью в результате индуцированного им окислительного стресса в бактериальных клетках.

Для определения связи интенсивности люминесцентного ответа с количеством жизнеспособных бактерий была проведена серия экспериментов по одновременному изучению люминесценции и выживаемости бактерий биосенсора pSoxS-lux непосредственно в культивируемой суспензии в ячейках планшета. Через 90 мин инкубации бактерий с паракватом в концентрациях 10⁻² и 10⁻¹ моль/л снимали данные по люминесцентному ответу. Затем аликвоту бактерий 0.1 мл из ячеек поэтапно разбавляли в 0.9%-ном растворе хлорида натрия и с

каждого разведения высевали по 0.1 мл на чашки Петри с питательной средой LB. После 20 ч инкубации чашек при 37°C подсчитывали количество выросших колоний. Для вычисления количества жизнеспособных бактерий (КОЕ – колониеобразующих единиц) в ячейках число колоний умножали на 2 (в лунке 0.2 мл суспензии бактерий), затем на степень разведения. Для определения интенсивности люминесценции биосенсора pSoxS-lux в пересчете на 1000 жизнеспособных клеток (КОЕ) был проведен следующий расчет. Показатель интенсивности люминесцентного ответа биосенсора при определенной концентрации параквата делили на число КОЕ в лунке при этой концентрации и умножали на 1000. Полученные результаты приведены табл. 1.

Число жизнеспособных бактерий в лунках контрольного варианта составило в среднем 4 × 10⁷. В вариантах с паракватом в концентрациях 0.01 и 0.1 моль/л количество жизнеспособных бактерий снижалась в 4 и 400 раз соответственно.

Таблица 1. Зависимость интенсивности люминесцентного ответа и выживаемости клеток биосенсора pSoxS-lux от концентрации параквата
Table 1. Dependence of the intensity of the luminescent response and cell survival of the pSoxS-lux biosensor on the paraquat concentration

Вариант эксперимента	Число КОЕ в лунке *	Люминесценция, в отн. ед.	
		в лунке	на 1000 КОЕ
Контроль (вода)	4 × 10 ⁷	5286	0.13
Паракват, 0.01 моль/л	1 × 10 ⁷	43566	4.36
Паракват, 0.1 моль/л	1 × 10 ⁵	11948	119.48

* Значимость отличий между результатами в вариантах с паракватом и контролем *p* < 0.001.

Таблица 2. Влияние антиоксидантов ACC и GSH в концентрации 0.01 моль/л на жизнеспособность бактерий биосенсора pSoxS-lux, обработанных паракватом (0.01 моль/л и 0.1 моль/л)**Table 2.** Effect of N-acetylcysteine (ACC) and reduced glutathione (GSH) at a concentration of 0.01 mol/L on the viability of bacteria of the pSoxS-lux biosensor treated with paraquat (0.01 mol/l and 0.1 mol/l)

Паракват, моль/л	Число КОЕ в 0.1 мл*		
	Контроль**	GSH 0.01 моль/л	ACC 0.01 моль/л
Контроль (вода)	2×10^7	2×10^7	1.9×10^7
Паракват, 0.01	5.1×10^6	1.9×10^7	1.9×10^7
Паракват, 0.1	5.3×10^4	1.2×10^6	1.0×10^6

*Числа КОЕ показывают количество бактерий в 0.1 мл аликвоты, перенесенной на чашки Петри из разведений 10^{-5} , 10^{-4} и 10^{-3} культуры.**Значимость отличий между результатами в вариантах с паракватом и контролем $p < 0.001$.

В контрольном образце, не обработанном паракватом, люминесценция 1000 клеток составляла 0.13 единиц. Люминесценция 1000 клеток при концентрации параквата 0.01 моль/л более чем в 30 раз превышала контрольную, составляя 4.36 единиц. Концентрация же параквата в 0.1 моль/л вызывала люминесценцию 1000 клеток в 119.48 единиц. Это в 919 раз больше, чем у контрольного образца, и в 27 раза больше, чем у образца с концентрацией параквата 0.01 моль/л. Из этих данных следует, что с увеличением концентрации параквата часть бактерий гибнет, а в клетках жизнеспособных бактерий происходит усиление экспрессии гена супероксиддисмутазы в ответ на увеличение концентрации супероксид анион-радикала, генерируемого паракватом.

Было проведено изучение влияния антиоксидантов N-ацетилцистеина (ACC) и восстановленного глутатиона (GSH) на интенсивность люминесценции биосенсоров pKatG-lux и pSoxS-lux, индуцированной паракватом в концентрациях 0.01 и 0.1 моль/л. Результаты приведены на рис. 2 и 3. На всех графиках в качестве ошибки указано SE. Над столбиками указаны p -значения при сравнении с вариантом без антиоксиданта (контроль). Антиоксиданты снижали интенсивность люминесценции обоих биосенсоров, индуцированной паракватом в наиболее эффективной концентрации 0.01 моль/л. В случае токсичной для бактерий концентрации параквата 0.1 моль/л оба антиоксиданта повышали интенсивность люминесценции биосенсоров. Это свидетельствует о том, что снижение уровня люминесцентного ответа биосенсоров на паракват в концентрации 0.01 моль/л обусловлено инактивацией антиоксидантами супероксид-аниона и пероксида водорода. В то же время снижение антиоксидантами окислительного стресса в бактериальных клетках приводит к увеличению их выживаемости при высокой концентрации параквата, что и является причиной увеличения уровня люминесценции.

Таким образом, нивелирование ACC и GSH окислительного стресса в бактериальных клетках

приводит к разнонаправленным результатам: снижению люминесцентного ответа биосенсоров при концентрации параквата 0.01 моль/л и повышению такого же ответа биосенсоров при токсичной концентрации параквата (0.1 моль/л).

В случае биосенсора pSox-lux нами была проведена количественная оценка выживаемости бактерий в вариантах эксперимента: контроль, паракват + ACC и паракват + GSH (табл. 2). Для этого 0.1 мл суспензии бактерий из ячеек разводили до 10^{-5} , 10^{-4} и 10^{-3} и по 0.1 мл из разведений высевали на чашки Петри с питательным агаром. Через 20 ч инкубации подсчитывали число выросших колоний. Для вычисления количества жизнеспособных бактерий (КОЕ – колониеобразующих единиц) в 0.1 мл суспензии умножали на степень разведения. В контроле ACC и GSH не влияли на жизнеспособность бактерий *E. coli* – концентрация бактерий составила 2×10^7 КОЕ. В опыте антиоксидант + паракват в концентрации 0.01 моль/л ACC и GSH увеличивали число КОЕ почти в 4 раза с 5×10^6 до 1.9×10^7 , т.е. до контрольного уровня. В опыте с паракватом в концентрации 0.1 моль/л число КОЕ составило 5.3×10^4 , т.е. выживаемость бактерий была в 100 раз ниже, чем в случае его концентрации 0.01 моль/л. Добавление ACC и GSH в концентрации 0.01 моль/л увеличивало число жизнеспособных бактерий до 1.2×10^6 КОЕ, что почти в 20 раз превышает число КОЕ. При этом ACC и GSH увеличивали число КОЕ в равной степени.

Для выяснения способности параквата индуцировать повреждения в ДНК (разрывы) бактерий биосенсора pSoxS-lux и влияния антиоксидантов на его генотоксичность был использован метод гель-электрофореза. Использовали паракват в концентрации 0.1 моль/л и ACC и GSH в концентрациях 0.01 и 0.001 моль/л. Степень поврежденности ДНК определяли по количеству ДНК,двигающейся в сторону анода в агарозном геле (рис. 4). Паракват показал слабую генотоксичность (дорожка 7). Антиоксиданты в концен-

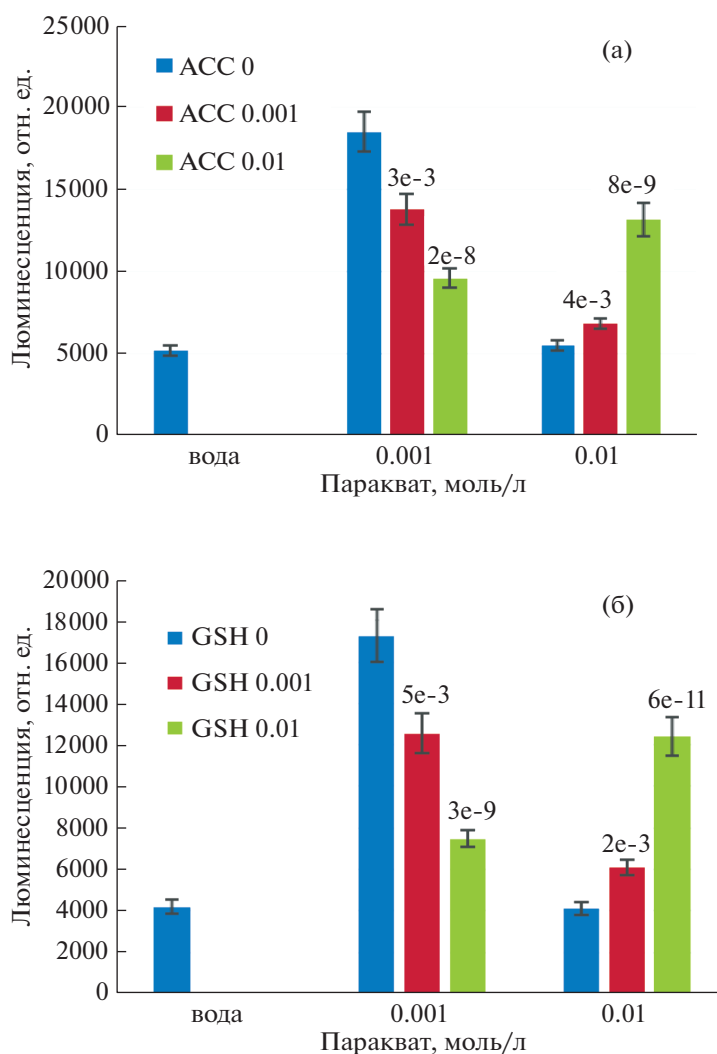


Рис. 2. Влияние N-ацетилцистеина (ACC) (а) и восстановленного глутатиона (GSH) (б) на люминесцентный ответ pKatG-lux на паракват в условных единицах светового потока.

Fig. 2. Effect of N-acetylcysteine (ACC) (a) and reduced glutathione (GSH) (b) on the luminescent response of pKatG-lux to paraquat in arbitrary units of luminous flux.

трации 0.001 моль/л не оказали заметного влияния на степень генотоксичности параквата (дорожки 5 и 6), однако они эффективно снижали фрагментацию ДНК паракватом в концентрации 0.01 моль/л (дорожки 3 и 4).

ОБСУЖДЕНИЕ

Повреждение ДНК свободными радикалами может произойти в результате воздействия ионизирующего излучения или химических радиомиметиков. Изучение радиомиметического эффекта параквата на клеточной линии V79 как отдельно, так и в сочетании с воздействием облучения показало, что летальное действие на клетки зависит от его концентрации, и при нетоксичных концентрациях паракват проявляет себя как радиосенсибилизатор до и во время облучения клеток [31].

Среди химических радиомиметиков особое место занимают блеомицин, неокарциностаин и другие цитостатики. Образующие блеомицином свободные радикалы индуцируют двухцепочечные разрывы в ДНК, вызывают хромосомные aberrации в клеточных культурах, из которых от 60 до 70% являются дицентрическими хромосомами [32].

В настоящей работе использовали биосенсоры pSoxS-lux и pKatG-lux, которые несут рекомбинантную плазмиду, содержащую промоторы гена супероксиддисмутазы *soxS* и гена каталазы *katG*, соединенную с lux-опероном *Photobacterium luminescens*. Изначально в бактериальной клетке промоторы генов супероксиддисмутазы и каталазы находятся в заблокированном состоянии. При увеличении концентрации супероксида или перокси-

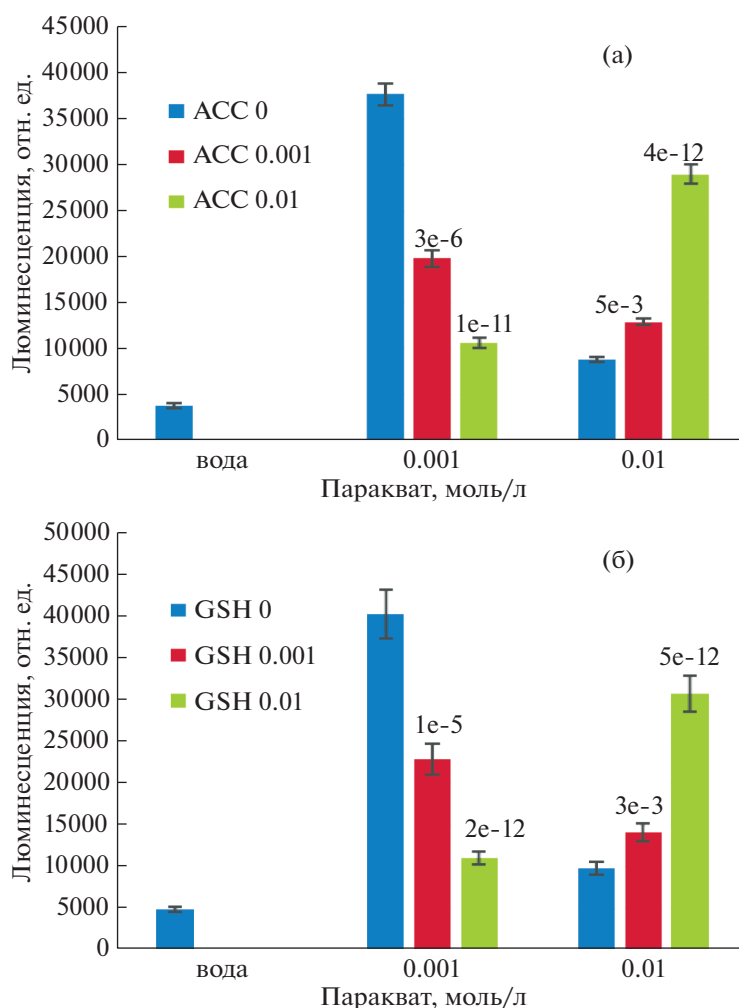


Рис. 3. Влияние N-ацетилцистеина (ACC) (а) и восстановленного глутатиона (GSH) (б) на люминесцентный ответ pKatG-lux на паракват в условных единицах светового потока.

Fig. 3. Effect of N-acetylcysteine (ACC) (a) and reduced glutathione (GSH) (b) on the luminescent response of pSoxS-lux to paraquat in arbitrary units of luminous flux (the concentrations of substances in the wells of the plate are given).

да выше физиологического уровня они вступают в реакцию с соответствующими белками-активаторами и происходит разблокировка промоторов, в результате чего lux-оперон транскрибируется и биосенсоры pSoxS-lux люминесцируют. Таким образом, lux-биосенсоры позволяют детектировать увеличение в клетке концентрации перекиси водорода в случае люминесцентного ответа pKatG-lux и концентрации супероксид-аниона в случае люминесцентного ответа pSoxS-lux.

Изучение зависимости интенсивности люминесцентного ответа и выживаемости клеток биосенсора pSoxS-lux от концентрации параквата показало, что с увеличением концентрации параквата часть бактерий гибнет, а в клетках жизнеспособных бактерий происходит усиление экспрессии гена супероксиддисмутазы. Например, интенсивность люминесценции биосенсора

pSoxS-lux при пересчете на 1000 жизнеспособных бактерий в концентрации параквата 0.1 моль/л составила 119.48 условных единиц, что в 919 раз больше, чем у контрольного образца, и в 27 раз больше, чем у образца, обработанного паракватом в концентрации 0.01 моль/л (табл. 1). Подобный феномен ранее нами был описан при изучении генотоксичности диоксида с помощью биосенсора pColD-lux – высокие концентрации этого препарата приводили к гибели части бактерий, а у выживших бактерий усиливалась интенсивность SOS-репарации ДНК [33].

Антиоксидантная система, включающая супероксиддисмутазу и каталазу, защищает организм от токсического действия избыточных концентраций супероксидного анион-радикала и перекиси водорода. Она в нормальных физиологических условиях поддерживает минимальный

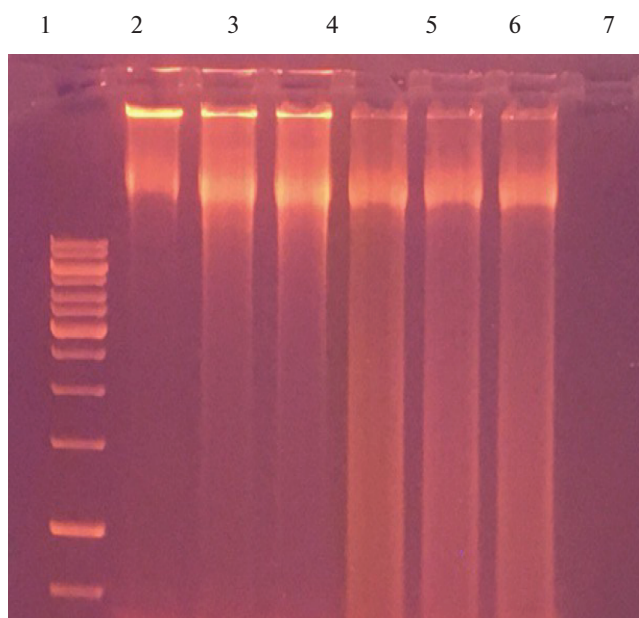


Рис. 4. Влияние АСС и GSH на ДНК-повреждающую активность параквата в концентрации 0.1 моль/л в клетках биосенсора pSoxS-lux: 1 – леддер; 2 – контроль (вода); 3 – паракват + АЦЦ 0.01 моль/л; 4 – паракват + GSH 0.01 моль/л; 5 – паракват + АЦЦ 0.001 моль/л; 6 – паракват + GSH 0.001 моль/л; 7 – паракват.

Fig. 4. Effect of N-acetylcysteine (ACC) and reduced glutathione (GSH) on the DNA-damaging activity of paraquat at a concentration of 0.1 mol / L in pSoxS-lux biosensor cells: 1 – ladder; 2 – control (water); 3 – paraquat + ACC 0.01 mol / l; 4 – paraquat + GSH 0.01 mol / l; 5 – paraquat + ACC 0.001 mol / l; 6 – paraquat + GSH 0.001 mol / l; 7 – paraquat.

(<50 мкмоль/л) контролируемый уровень супероксида и пероксида водорода, необходимого для осуществления многих клеточных процессов [34]. В случае увеличения концентраций супероксида и перекиси водорода в клетках выше физиологически необходимого уровня происходит развитие оксидативного стресса, приводящего к цитотоксическим и генотоксическим последствиям.

Антиоксиданты N-ацетилцистеин и восстановленный глутатион снижали интенсивность люминесцентного ответа обоих биосенсоров на паракват концентрации 0.01 моль/л. Это свидетельствует о том, что антиоксиданты снижают внутриклеточную концентрацию супероксида и пероксида водорода, генерированных паракватом в клетке. В случае токсичной концентрации параквата 0.1 моль/л антиоксиданты, наоборот, повышали интенсивность люминесценции биосенсоров. Это указывает на то, что антиоксиданты повышают выживаемость бактерий, что и приводит к увеличению количества люминесцирующих бактерий. Это предположение получило подтверждение, при одновременном определении люминесценции и выживаемости бактерий,

путем учета КОЕ. Например, паракват в концентрации 0.1 моль/л вызывал люминесценцию 1000 клеток биосенсора pSoxS-lux в 919 раз больше, чем у контрольного образца, и в 27 раз больше, чем у образца, с концентрацией параквата 0.01 моль/л (табл. 2).

Гель-электрофорез ДНК, выделенной из клеток биосенсора pSoxS-lux, обработанных паракватом в концентрации 0.1 моль/л, показал, что антиоксиданты в концентрации 0.001 моль/л не снижают степень поврежденности ДНК, тогда как в концентрации 0.01 моль/л снижают ее почти до уровня контрольного образца ДНК (рис. 4). В целом гель-электрофорез ДНК бактерий показал, что паракват является слабым генотоксикантом, вызывающим разрывы ДНК.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Показана токсичность параквата для бактерий *E. coli*, его способность генерировать в бактериальной клетке супероксид анион-радикал и пероксид водорода, а также способность повреждать ДНК бактерий. Впервые выявлен феномен усиления экспрессии гена супероксиддисмутазы почти в 1000 раз в клетках жизнеспособных бактерий при токсичной концентрации параквата, приводящей к снижению выживаемости бактерий в 400 раз. Антиоксиданты АСС и GSH снижали генотоксические и цитотоксические эффекты параквата, а также интенсивность генерации им оксидативных соединений, таких как супероксид-анион и перекись водорода.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Honoré P., Hantson P.H., Fauville J.P.H. et al.* Paraquat poisoning: State of the Art // *Acta Clinica Belgica*. 1994. V. 49. № 5. P. 220–228.
2. Program international sur la Security des Substances chimiques. Critères d'hygiène de l'environnement 39: Paraquat et diquat // *Mondiale de la santé organization*. Geneva. 1986. P. 15–113.
3. *Ponce P., Lobos A.V., Bordalo J., Moreira J.* Treatment of paraquat poisoning. Plasmapheresis vs hemodialysis // *Minutes Med. Port*. 1986. V. 7. № 5–6. P. 193–196.
4. *Wesseling C., Hogstedt C., Picado A., Johansson L.* Unintentional fatal paraquat poisonings among agricultural workers in Costa Rica: report of 15 cases // *Am. J. Industry Med*. 1997. V. 32. № 5. P. 433–441. [https://doi.org/10.1002/\(sici\)1097-0274\(199711\)32:5<433::aid-ajim1>3.0.co;2-t](https://doi.org/10.1002/(sici)1097-0274(199711)32:5<433::aid-ajim1>3.0.co;2-t)
5. *Cocheme H.M., Murphy M.P.* Complex I is the major site of mitochondrial superoxide production by paraquat // *J. Biol. Chem*. 2008. V. 283. № 4. P. 1786–1798. <https://doi.org/10.1074/jbc.M708597200>
6. *Watt M.* Paraquat monograph, Pesticide Action Network Asia and the Pacific. Penang, Malaysia, 2011. P. 27–29.

7. Speit G., Haupter S., Hartmann A. Evaluation of the genotoxic properties of paraquat in V79 Chinese hamster cells // *Mutat. Res.* 1998. V. 412. № 2. P. 187–193. [https://doi.org/10.1016/s1383-5718\(97\)00199-x](https://doi.org/10.1016/s1383-5718(97)00199-x)
8. Lheureux P., Leduc D., Vaubinst R., Askenasi R. Survival in a case of massive paraquat ingestion // *Chest.* 1995. V. 107. № 1. P. 285–289. <https://doi.org/10.1378/CHEST.107.1.285>
9. Molck A.M., Friis C. The cytotoxic effect of paraquat to isolated renal proximal tubular segments from rabbits // *Toxicology.* 1997. V. 122. № 1–2. P. 123–132. [https://doi.org/10.1016/s0300-483x\(97\)00088-7](https://doi.org/10.1016/s0300-483x(97)00088-7)
10. Bairaktari E., Katopodis K., Siamopoulos K.C., Tsolas O. Paraquat-induced renal injury studied by ¹H nuclear magnetic resonance spectroscopy of urine // *Clin. Chem.* 1998. V. 44. № 6. P. 1256–1261.
11. Fairshter R.D., Wilson A.F. Paraquat poisoning-manifestations and therapy // *Am. J. Med.* 1975. V. 59. № 6. P. 751–753. [https://doi.org/10.1016/0002-9343\(75\)90459-3](https://doi.org/10.1016/0002-9343(75)90459-3)
12. Brooks A.I., Chadwick C.A., Gelbard H.A., et al. Paraquat elicited neurobehavioral syndrome caused by dopaminergic neuron loss // *Brain Res.* 1999. V. 823. № 1–2. P. 1–10. [https://doi.org/10.1016/s0006-8993\(98\)01192-5](https://doi.org/10.1016/s0006-8993(98)01192-5)
13. Ribas G., Surralles J., Carbonell E. et al. Genotoxic evaluation of the herbicide paraquat in cultured human lymphocytes // *Teratog. Carcinog. Mutagen.* 1997. V. 17. № 6. P. 339–347.
14. Zhang W.-H., Yang Y., Lin C.J., Wang Q. Antioxidant attenuation of ROS-involved cytotoxicity induced by paraquat on HL-60 cells // *Health (N. Y.).* 2010. V. 2. № 3. P. 253–261. <https://doi.org/10.4236/health.2010.23036>
15. Jee S.H., Kuo H.W., Su W.P., et al. Photodamage and skin cancer among paraquat workers // *Int. J. Dermatol.* 1995. V. 34. № 7. P. 466–469. <https://doi.org/10.1111/j.1365-4362.1995.tb00611.x>
16. Wesseling C., van Wendel de Joode B., Ruepert C. et al. Paraquat in developing countries // *Int. J. Occup. Environ. Health.* 2001. V. 7. № 4. P. 275–286. <https://doi.org/10.1179/107735201800339209>
17. Jovtchev G., Gateva S., Stergios M., Kulekova S. Cytotoxic and genotoxic effects of paraquat in *Hordeum vulgare* and human lymphocytes in vitro // *Environ. Toxicol.* 2010. V. 25. № 3. P. 294–303. <https://doi.org/10.1002/tox.20503>
18. Petrovska H., Dusinska M. Oxidative DNA damage in human cells induced by paraquat // *Altern. Lab. Anim.* 1999. V. 27. № 3. P. 387–395.
19. Zienolddiny S., Ryberg D., Haugen A. Induction of microsatellite mutations by oxidative agents in human lung cancer cell lines // *Carcinogenesis.* 2000. V. 21. № 8. P. 1521–1526. <https://doi.org/10.1002/tox.20503>
20. Kuo M.L., Lin J.K. The genotoxicity of the waste water discharged from paraquat manufacturing and its pyridyl components // *Mutat. Res.* 1993. V. 300. № 3–4. P. 223–229. [https://doi.org/10.1016/0165-1218\(93\)90054-h](https://doi.org/10.1016/0165-1218(93)90054-h)
21. Tokunaga I., Kubo S., Mikasa H. et al. Determination of 8-hydroxy-deoxyguanosine formation in rat organs: assessment of paraquat-evoked oxidative DNA damage // *Biochem. Mol. Biol. Int.* 1997. V. 43. № 1. P. 73–77. <https://doi.org/10.1080/1521654970020383>
22. Rios A.C., Salvadori D.M., Oliveira S.V., Ribeiro L.R. The action of the herbicide paraquat on somatic and germ cells of mice // *Mutat. Res.* 1995. V. 328. № 1. P. 113–118. [https://doi.org/10.1016/0027-5107\(94\)00199-f](https://doi.org/10.1016/0027-5107(94)00199-f)
23. D'Souza U.J., Narayana K., Zain A. et al. Dermal exposure to the herbicide-paraquat results in genotoxic and cytotoxic damage to germ cells in the male rat // *Folia Morphol. (Warsz).* 2006. V. 65. № 1. P. 6–10.
24. Yin X.H., Li S.N., Zhang L. et al. Evaluation of DNA damage in Chinese toad (*Bufo bufo gargarizans*) after *in vivo* exposure to sublethal concentrations of four herbicides using the comet assay // *Ecotoxicology.* 2008. V. 17. № 4. P. 280–286. <https://doi.org/10.1007/s10646-008-0195-z>
25. Sorensen M., Loft S. No significant paraquat-induced oxidative DNA damage in rats // *Free Radic. Res.* 2000. V. 32. № 5. P. 423–428. <https://doi.org/10.1080/1071576000300421>
26. Nakamura S.I., Oda Y., Shimada T. et al. SOS-inducing activity of chemical carcinogens and mutagens in *Salmonella typhimurium* A1535/pSK1002: examination with 151 chemicals // *Mutat. Res.* 1987. V. 192. № 4. P. 239–246. [https://doi.org/10.1016/0165-7992\(87\)900637](https://doi.org/10.1016/0165-7992(87)900637)
27. Yonei S., Noda A., Tachibana A., Akasaka S. Mutagenic and cytotoxic effects of oxygen free radicals generated by methylviologen (paraquat) on *Escherichia coli* with different DNA-repair capacities // *Mutat. Res.* 1986. V. 163. № 1. P. 15–22. [https://doi.org/10.1016/0027-5107\(86\)90053-9](https://doi.org/10.1016/0027-5107(86)90053-9)
28. Benigni R., Bignami M., Carere A. et al. Mutational studies with diquat and paraquat in vitro // *Mutat. Res.* 1979. V. 68. № 3. P. 183–193. [https://doi.org/10.1016/0165-1218\(79\)90148](https://doi.org/10.1016/0165-1218(79)90148)
29. Котова В.Ю., Манухов И.В., Завильгельский Г.Б. Lux-биосенсоры для детекции SOS-ответа, теплового шока и окислительного стресса // *Биотехнология.* 2009. № 6. С. 16–25. [Kotova V.Yu., Manukhov I.V., Zavilgelsky G.B. Lux-Biosensors for Detection of SOS-Response, Heat Shock, and Oxidative Stress // *Applied Biochemistry and Microbiology.* 2010. V. 46. № 8. P. 781–788. <https://doi.org/10.1134/S0003683810080089>]
30. Игонина Е.В., Марсова М.В., Абилев С.К. Lux-биосенсоры: скрининг биологически активных соединений на генотоксичность // *Экол. генетика.* 2016. Т. 9. № 4. С. 52–62. [Igonina E.V., Marsova M.V., Abilev S.K. Lux-biosensory: skring biologicheski aktivnyh soedinenij na genotoksichnost' // *Ekol. genetika.* 2016. V. 9. № 4. P. 52–62. (in Russ.) <https://doi.org/10.17816/ecogen14452-62>]
31. Miller R.C., Fujikura T., Hiraoka T., Tenou H. Paraquat induced radiosensitization of mammalian cells // *J. Radiat. Res.* 1986. V. 27. P. 163–170.
32. Venkatachalam P., Jayanth V.R., Solomon F. et al. Modifications of Bleomycin Induced Cytogenetic Damages by 2-Deoxy-D-Glucose on Normal and Tumor Cells // *Int. J. Hum. Genet.* 2007. V. 7. P. 307–314.

33. Свиридова Д.А., Мачигов Э.А., Игонина Е.В. и др. Изучение механизма генотоксичности диоксида с помощью lux-биосенсоров *Escherichia coli* // Радиационная биология. Радиоэкология. 2020. Т. 60. № 6. С. 595–603. [Sviridova D.A., Machigov E.A., Igonina E.V. et al. Study of the Mechanism of Dioxidine Genotoxicity using lux-Biosensors of *Escherichia coli* // Radiat. Biol. and Radioecol. 2020. V. 60. № 6. P. 595–603. (in Russ)].
<https://doi.org/10.31857/S0869803120060223>
34. Биохимия оксидативного стресса: Учебно-методическое пособие // ФГБОУ ВО РНИМУ имени Н.И. Пирогова Минздрава России. М.: Изд-во XX, 2018. 60 с. [Biohimiya oksidativnogo stressa: Uchebno-metodicheskoe posobie // FGBOU VO RNIMU imeni N.I. Pirogova Minzdrava Rossii. Moskva, Izdatel'stvo XX, 2018. 60 s. (in Russ.)]

Genotoxic Effect of Paraquat Radiomimetic on *Escherichia coli* Bacteria

E. A. Machigov^a, E. V. Igonina^a, D. V. Sviridova^a, A. V. Rubanovich^a, and S. K. Abilev^{a,b,#}

^aVavilov Institute of General Genetics, Russian Academy of Sciences, Moscow 117971, Russia

^bLomonosov Moscow State University, Moscow 119234, Russia

[#]E-mail: abilev@vigg.ru

Paraquat at a concentration of 0.01 mol/L caused the most intense luminescence of *E. coli* pSoxS-lux and *E. coli* pKatG-lux biosensors, which indicates the formation of superoxide anion radical ($O_2^{\cdot-}$) and hydrogen peroxide (H_2O_2) in bacterial cells, respectively. At a paraquat concentration of 0.1 mol/L, a decrease in the intensity of luminescence of biosensors was observed, which was associated with a decrease in the survival of bacteria from 4×10^7 in the control to 1×10^5 in the experiment of colony-forming units (CFU). As a result of recalculating the luminescence intensity index per 1000 CFU, a sharp increase in the expression of the superoxide dismutase gene from 0.13 in the control to 4.36 and 119 conventional units at paraquat concentrations of 0.01 mol/L and 0.1 mol/L, respectively, was shown. The antioxidants glutathione and N-acetylcysteine reduced the concentration of free radicals generated by paraquat in cells and increased bacterial survival. The method of gel electrophoresis revealed the DNA-damaging ability of paraquat, the severity of which depends on both its concentration and the concentration of antioxidants.

Keywords: paraquat, superoxide radical anion, hydrogen peroxide, biosensors, *Escherichia coli*, antioxidants, bacterial survival, DNA fragmentation, electrophoresis